

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

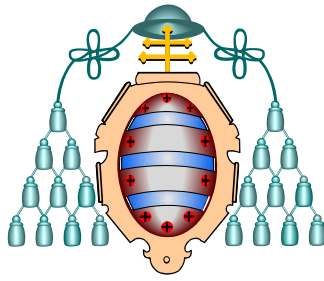
PROGRAMA DOCTORADO

MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

TÍTULO

ENFERMEDAD DE PARKINSON: CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN 3'UTR DE
LOS GENES SNCA Y LRRK2 Y miRNOMA DE TEJIDO CEREBRAL Y PLASMA
SANGUÍNEO

AUTORA: LUCÍA FERNÁNDEZ CARDO



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

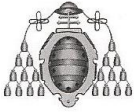
PROGRAMA DOCTORADO

MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

TÍTULO

ENFERMEDAD DE PARKINSON: CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN 3'UTR DE LOS GENES SNCA Y LRRK2 Y miRNOMA DE TEJIDO CEREBRAL Y PLASMA SANGUÍNEO

AUTORA: LUCÍA FERNÁNDEZ CARDO



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica
y Nuevas Titulaciones



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

PRESIDENTE DE LA COMISION ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO MORFOLOGIA Y BIOLOGÍA CELULAR

Contra la presente resolución podrá interponer recurso de alzada ante el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad en el plazo de un mes a contar desde el siguiente a la recepción de la presente resolución, de acuerdo con lo previsto en el artículo 114 de la Ley 30/92, de 26 de noviembre, del Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y Procedimiento Administrativo Común (B.O.E. de 27 de noviembre), modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero (B.OE. de 14 de enero)



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Enfermedad de Parkinson: caracterización de la región 3'UTR de los genes <i>SNCA</i> y <i>LRRK2</i> y del miRNoma de tejido cerebral y plasma sanguíneo	Inglés: Parkinson's disease: characterization of the 3'UTR region of <i>SNCA</i> and <i>LRRK2</i> genes and the miRNoma of brain tissue and blood plasma
2.- Autor	
Nombre: LUCÍA FERNÁNDEZ CARDO	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado:MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR	
Órgano responsable:DPTO.MORFOLOGIA Y BIOLOGIA CELULAR	

RESUMEN (en español)

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno del movimiento, neurodegenerativo, progresivo y crónico, que afecta al 1-2% de los mayores de 60 años. Los signos motores que acompañan a la enfermedad son debidos a la pérdida de neuronas dopaminérgicas (ND) en la *pars compacta* de la *Sustantia nigra* (SNpc) y a la consiguiente disminución de los niveles de dopamina en el estriado. En la EP, intervienen numerosos procesos fisiológicos y celulares y son varios los mecanismos de interacción entre los diferentes genes: función mitocondrial, estrés oxidativo, reciclaje de vesículas sinápticas...

Los microRNAs (miRNAs) son ARNs no codificantes de unos 22-24 nt que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Intervienen en la regulación de procesos del desarrollo, morfogénesis y adaptación del organismo a cambios, estando su desregulación asociada a múltiples procesos patológicos, incluyendo los tumorales y los neurodegenerativos

Uno de los objetivos principales del proyecto, era el estudio de la variabilidad genética en la región 3'UTR de los genes *SNCA* y *LRRK2* y su posible implicación como factor de riesgo o protección de la enfermedad. El segundo objetivo principal se dirigió a la determinación del perfil de expresión de miRNAs en plasma sanguíneo y tejido cerebral proveniente de pacientes con EP y de donantes sanos.

Estudios gen *SNCA*

La variación genética en la región 3'UTR se estudió en 752 EP de la población asturiana y 480 controles sanos y se describieron un total de seis variantes. Únicamente rs356165



mostraba una asociación con la enfermedad, replicándose en una cohorte de Navarra. El alelo de riesgo G parece modificar la edad de inicio.

Se han descrito 4 isoformas predominantes en el gen *SNCA*: *SNCA*-140, -126, -112 y -98 y nos propusimos cuantificar su expresión mediante PCR semicuantitativa a tiempo real. Utilizamos ARN obtenido de tejido cerebral de tres regiones (SN, CB y CO) de donantes con EP (N=9) y sin patología cerebral (N=6). La comparación de los niveles de expresión relativa de los transcritos en la SN no mostró diferencias entre pacientes y donantes sanos, tampoco la comparación según el genotipo de rs356165. En CB encontramos diferencias entre pacientes y controles para los niveles de expresión de los transcritos cortos *SNCA*-112 y *SNCA*-98.

Estudios gen *LRRK2*

La variación en la región 3'UTR del gen *LRRK2* se determinó en la cohorte de Asturias. Hallamos doce variantes, mostrando únicamente el rs66737902 diferencias estadísticas en la comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre pacientes y controles. Nos planteamos investigar si la asociación del alelo rs66737902-C y la EP podría ser explicada por un efecto sobre la unión de algún miRNA. Seleccionamos a miR-138.2-3p como candidato y realizamos ensayos de expresión renilla-luciferasa en células HEK-293 para determinar si ejercía un efecto en la expresión de la 3'UTR de *LRRK2*. No encontrando diferencias significativas entre las células transfectadas o no con el pre-miR-138.2-3p.

Cuantificamos los niveles de ARN de *LRRK2* en el tejido cerebral y encontramos diferencias en la expresión relativa de *LRRK2* en la SN de los pacientes según fuesen o no portadores del alelo de riesgo rs66737902 C.

Expresión de miRNAs en tejido cerebral

Estudiamos la expresión de miRNAs en la SN de los donantes de tejido, observamos que los enfermos presentaban una menor expresión global de miRNAs. Se seleccionaron 7 miRNAs con expresión diferencial: miR-369-3p, miR-450b-3p, miR-136, miR-337-5p, miR-508-5p, miR-548d y miR-579 y se ensayaron con sondas TaqMan individuales en las 14 muestras de SN. Únicamente miR-136 mostró diferencias significativas en los niveles de expresión ($p=0,025$).

Los niveles de los 7 miRNAs candidatos se determinaron también en CB y CO no observando diferencias entre pacientes y controles. Realizamos una predicción de las posibles rutas fisiológicas relacionadas con la EP que podrían ser reguladas por miR-136, entre ellas se encuentran varias previamente relacionadas con la EP, como las de



señalización de la insulina, TGF- β o MAPK.

Expresión de miRNAs en plasma sanguíneo

Estudiamos el perfil de expresión de los 360 miRNAs humanos mejor caracterizados en el plasma de 31 pacientes con EP y 25 controles sanos. Tras analizar los resultados obtenidos en las TLDAs, los siguientes miRNAs estaban sobre o infra-representados en el plasma de los pacientes: miR-125a-3p, -137, -181c, -193a-3p, -196b, -331-5p y -454. Estos miRNAs fueron cuantificados individualmente en cada plasma de pacientes y controles. Únicamente miR-331-5p mostró diferencias significativas entre los dos grupos con una expresión relativa >20X en EP frente a controles. La expresión de miR-331-5p se cuantificó en el grupo con EA, hallando niveles similares a los del grupo control y menores que los hallados en los EP.

RESUMEN (en Inglés)

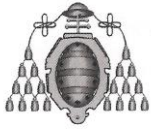
Parkinson's disease (PD) is a movement disorder, neurodegenerative, progressive and chronic, affecting to 1-2% of those over 60 years. The motor signs that accompany the disease are due to the loss of dopaminergic neurons (ND) in the *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) and the consequent decrease of dopamine levels in the striatum. The pathology of PD involves many physiological and cellular processes and several mechanisms of interaction between the different genes involved: mitochondrial function, oxidative stress, synaptic vesicle recycling ...

MicroRNAs (miRNAs) are noncoding RNAs about 22 to 24 nt that regulate gene expression at the post-transcriptional level. They are involved in the regulation of developmental processes, morphogenesis and adaptation of the organism to change; their deregulation has been associated with multiple pathological processes, including tumor and neurodegeneration.

One of the project main objectives was to study the genetic variability in the 3'UTR region of *SNCA* and *LRRK2* genes, and their possible role as a disease risk or protection factor. The second main objective was the determination of the miRNAs expression profile in blood plasma and brain tissue from PD patients and healthy donors.

SNCA gene studies

The genetic variation in the 3'UTR region was studied in 752 patients from the Asturian population and 480 healthy controls, six variants were reported. Only rs356165 showed an



association with the disease, replicating in a cohort of Navarra. The risk allele G seems to modify the age of onset.

Four predominant isoforms have been described in the *SNCA* gene: *SNCA*-140, -126, -112 and -98 and we aimed to quantify their expression through real-time PCR. RNA was isolated in three brain regions (SN, CB and OC) from PD donors (N = 9) and subjects without pathology (N = 6). The comparison of the transcripts relative expression levels in the SN did not differ between patients and healthy donors. Comparison by rs356165 genotype neither differed. In CB, differences between patients and controls in the expression levels of the short transcripts *SNCA*-112 and *SNCA*-98 were found.

LRRK2 gen studies

The variation in the 3'UTR region of *LRRK2* was determined in the Asturias cohort. Of a total of twelve variants, only rs66737902 showed statistical differences in the comparison of genotypic and allelic frequencies between patients and controls. We investigated if the association of rs66737902-C allele and PD could be explained by an effect on the miRNA binding. We selected miR-138.2-3p as a candidate miRNA and carried out renilla-luciferase expression assays in HEK-293 cells to determine the effect on the expression of *LRRK2* 3'UTR. No significant differences were found between cells transfected or not with the pre-miR-138.2-3p.

We quantify the *LRRK2* RNA levels in brain tissue and found differences in the relative expression of *LRRK2* in the SN of patients according to whether or not they carry the risk allele rs66737902-C.

MiRNAs expression in brain tissue

We studied the miRNAs expression profile in the SN of tissue donors; we found that patients had a lower overall expression of miRNAs. Seven miRNAs with differential expression were selected: miR-369-3p, miR-450b-3p, miR-136, miR-337-5p, miR-508-5p, miR-548 d and miR-579 and tested with individual TaqMan probes in the 14 SN samples. Only miR-136 showed significant differences in the expression levels ($p = 0.025$).

The levels of the 7 candidate miRNAs were also determined in CB and CO finding no differences between patients and controls. We performed a prediction of the possible physiological pathways involved in PD that could be regulated by miR-136, among them are several previously associated with PD, such as insulin signaling, TGF- β and MAPK.



MiRNAs expression in blood plasma

We studied the expression profile of the 360 best characterized human miRNAs in the plasma of 31 PD patients and 25 healthy controls. After analyzing the results obtained in the TLDA, the following miRNAs were over- or under-represented in the patients' plasma: miR-125a-3p, -137, -181c, 193a-3p, -196b, -331-5p and -454. These miRNAs were quantified individually in each plasma sample. Only miR-331-5p showed significant differences between the two groups with a relative > 20X expression in PD versus controls. The expression of miR-331-5p was quantified in the AD group, finding similar results to those in the control group and lower levels than in PD.

Agradecimientos

A lo largo de este viaje, son muchas las personas que me acompañaron y ayudaron a completar con éxito todos los tramos necesarios para poder llegar a donde me encuentro ahora, por ello quería dar mi más sincero agradecimiento a:

El Dr. Coto y la Dra. Álvarez (Eli y Mavi) por darme la oportunidad de realizar mi iniciación en la investigación en el laboratorio de genética molecular y porque sin su apoyo y dirección este proyecto de Tesis Doctoral no sería posible.

A mis compañeras de laboratorio, becarias precarias todas, Doctoras ya la mayoría y amigas sin duda; porque siempre estuvisteis ahí en lo bueno y en lo malo, tanto personal como experimental. Ele, nos precediste a todas y fuiste referencia; Lore, fue mucho el tiempo compartido en la meseta y mucho de lo que se te lo debo a ti; María, siempre sonriente, si los microRNAs no matan, nos hacen más fuertes; Bea, estuviste presente desde el principio hasta el final y compartimos esta recta final, sin duda te echaré en falta; y Juan, no me olvido de ti, sabes que ya eres otra más.

Al resto de personal de Genética molecular que compartió diferentes momentos de este proceso y aunque ajenos a veces a lo que hacemos realmente en nuestras Tesis, siempre me dieron su apoyo.

A todos con los que compartí debates científicos, dudas protocolarias, opiniones e incluso nimiedades especialmente a la hora de comer.

A mis amigos, los que estuvieron ahí desde el colegio, los que forman parte de mi vida desde instituto, los que compartieron clases y mucho más en Biología y los que se unieron a este viaje por diferentes razones. Vosotros sois los que mejor me conocéis y aunque la mayoría no entendéis mucho de lo que aquí está escrito, siempre pude contar con vuestro apoyo.

A los que compartieron mi aventura en Seattle, al Dr. Zabetian por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio del VA Hospital y especialmente a Nacho por acogerme en Seattle, por toda la ayuda con el papeleo y por su apoyo.

A la Asociación Parkinson Asturias, por recordarnos cada 11 de abril por qué nos dedicamos a esto.

Por último, me queda agradecer a las personas más importantes en mi vida, a mis padres por su apoyo constante durante estos años de Doctorado y siempre, porque a pesar de que el mundo de la investigación les queda lejos, esta Tesis la vivieron muy de cerca. A mi hermano, que aún sabiendo lo que es esto apostó también por la investigación y no dudo de que tendrá éxito. A mis abuelos por su cariño y preocupación porque acabe lejos de aquí. A Xosé por estar ahí día a día y apoyarme incondicionalmente. Al resto de mi familia por su apoyo.

Gracias

“No nos hace falta valor para emprender ciertas cosas porque sean difíciles, sino que son difíciles porque nos falta valor para emprenderlas.”

(L. A. Séneca)

ABREVIATURAS

AD	Autosómica dominante
ADAR	<i>Adenosine deaminase acting on RNA</i>
ADNc	ADN complementario
AMS	Atrofia multisistémica
AR	Autosómica recesiva
ARNnc	ARN no codificante
DBC	Degeneración corticobasal
DCL	Degeneración con cuerpos de Lewy
DJ1	Oncogen DJ1
DL	Desequilibrio de ligamiento
CB	Cerebelo
CL	Cuerpos de Lewy
CNT	Controles
CO	Córtex occipital
COMPT	Catecol-O-metil transferasa
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EP	Enfermedad de Parkinson
FGF20	<i>Fibroblast growth factor 20</i>
FP	Factores protectores
FR	Factores de riesgo
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GB	Gánglios basales
GBA	<i>Glucosidase beta acid</i>
GP	Globo pálido
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GTP	Guanosin trifosfato
GWAS	<i>Genome wide association studies</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HUCA	Hospital universitario central de Asturias
IPM	Intervalo <i>postmortem</i>
L-DOPA	L-3, 4-dihidroxifenilalanina

LNDBB	<i>London neurodegenerative diseases brain bank</i>
LRRK2	<i>Leucine rich repeat kinase 2</i>
MAO-B	Monoamín oxidasa B
MAPT	<i>Microtubule-associated protein Tau</i>
miRNAs	MicroRNAs
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
ND	Neuronas dopaminérgicas
NL	Neuritas de Lewy
NST	Núcleo subtalámico
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
Pixt3	<i>Paired-like homeodomain transcription factor 3</i>
RISC	<i>Risk induced silencing complex</i>
RC	<i>Relative quantification</i>
PSP	Parálisis supranuclear progresiva
RFLP	<i>Random fragment lenght polymorphism</i>
ROC	<i>Ras of complex proteins</i>
RR	Riesgo relativo
SNCA	Alpha synuclein
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNpc	<i>Sustantia Nigra pars compacta</i>
SPECT	<i>Single-photon emission computed tomography</i>
SSCA	<i>Single strand conformation analysis</i>
TLDA	<i>TaqMan low density arrays</i>
UKPDBD	<i>UK Parkinson's Disease Brain Bank</i>
UV	Ultra violeta
3-OMD	3-metil-O-dopa
3'UTR	<i>3' Untraslated transcriptional region</i>

INDICE

INTRODUCCIÓN	11
1. Enfermedad de Parkinson.....	11
1.1. Definición y epidemiología de la enfermedad de Parkinson	11
1.2. Signos motores y no motores de la enfermedad.....	12
1.3. Criterios de diagnóstico clínico y técnicas de neuroimagen	14
1.4. Tratamiento farmacológico y quirúrgico	17
1.5. Neuropatología de la Enfermedad de Parkinson.....	19
1.6. Anatomía Patológica de la Enfermedad de Parkinson.....	21
2. Genética de la Enfermedad de Parkinson.....	24
2.1. <i>SNCA</i> (PARK1/4)	27
Función de la α -syn y patología asociada	28
2.2. <i>LRRK2</i> (PARK8).....	29
Función de <i>Lrrk2</i> y patología asociada	30
2.5. <i>SNCA</i> y <i>LRRK2</i> en la Enfermedad de Parkinson esporádica	31
2.6 Factores de riesgo (FR) y protección (FP) asociados a la enfermedad	32
3. MicroRNAs (miRNAs)	33
3.1. MiRNAs: biogénesis y mecanismos de actuación.....	33
3.2. MiRNAs y enfermedad de Parkinson.....	36
3.3. MicroRNAs como terapia en enfermedades neurodegenerativas	37
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Pacientes y controles	45
2. Tejidos cerebrales	45
3. Plasma sanguíneo y leucocitos	46
4. Análisis de la variación genética	46
4.1. Análisis de la conformación de la hebra sencilla (SSCA)	48
4.2 Genotipado mediante enzimas de restricción.....	49
4.3 Genotipado mediante sondas TaqMan.....	50

4.4. Secuenciación directa por el método de <i>Sanger</i>	51
5. Análisis de la unión de miRNAs a la 3'UTR de <i>LRRK2</i>	52
6. Extracción del ARN	54
6.1. ARN de plasma sanguíneo y leucocitos	54
6.2. ARN de tejido cerebral.....	54
7. Cuantificación relativa del ARNm de <i>SNCA</i> y <i>LRRK2</i>	56
8. Perfil de expresión de microRNAs.....	59
8.1. MiRNAs en el plasma.....	59
8.2 MiRNAs en tejido cerebral.....	61
9. Análisis estadístico	61
RESULTADOS	65
1. Características de los pacientes y controles	65
2. Mutaciones <i>LRRK2</i> p.R1441G/C y p.G2019S.....	66
3. Variación en la región 3' UTR del gen <i>SNCA</i>	66
5. Haplotipos de <i>SNCA</i>	72
6. Niveles de ARNm de <i>SNCA</i> en tejido cerebral.....	74
7. Variación en la región 3' UTR del gen <i>LRRK2</i>	79
8. Regulación de la expresión de <i>LRRK2</i> mediada por miRNAs	82
9. Niveles de ARNm de <i>LRRK2</i> en tejido cerebral	85
10. Perfil de expresión de miRNAs en tejido cerebral.....	86
11. Perfil de expresión de miRNAs en el plasma de EP.....	94
DISCUSIÓN	105
3'UTR de <i>SNCA</i>	106
3'UTR de <i>LRRK2</i>	108
Perfil de expresión de miRNAs en tejido cerebral.....	110
Perfil de expresión de miRNAs en el plasma	112
CONCLUSIONES.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	121
ANEXOS.....	133

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjkl **Introducción** ertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm
qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Parkinson

1.1. Definición y epidemiología de la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno del movimiento, neurodegenerativo, crónico y progresivo, que afecta a un 0,3 % de la población mundial y al 1-2% de los mayores de 60 años. Fue en 1817 cuando el médico inglés James Parkinson definió por primera vez esta enfermedad en su obra “Essay on the Shaking Palsy” (parálisis agitante), describiendo seis casos con los mismos criterios que se siguen utilizando en la actualidad: temblor en reposo, parálisis, postura anormal, distorsión del rostro y disminución de la fuerza muscular ^[1]. Sin embargo, sus estudios pasaron desapercibidos hasta que unos 40 años después el neurólogo francés Jean Martin Charcot amplió la definición de la enfermedad, distinguiendo entre rigidez, bradiquinesia y debilidad, y acuñó el término enfermedad de Parkinson ^[2].

Dentro de los trastornos del movimiento, la EP forma parte de los Síndromes extrapiramidales, subcategoría de parkinsonismos, que se dividen en:

1. Primarios: Enfermedad de Parkinson esporádica y familiar
2. Secundarios (adquiridos y sintomáticos): por infecciones, tóxicos, fármacos, vasculares, traumáticos...
3. Síndromes Parkinson plus o parkinsonismos atípicos: atrofia multisistémica (AMS), parálisis supranuclear progresiva (PSP), degeneración corticobasal (DCB), demencia con cuerpos de Lewy (DCL).
4. Heredodegenerativos: Enfermedades de Huntington, Wilson, y otras.

La EP es el trastorno neurodegenerativo con mayor incidencia después de la Enfermedad de Alzheimer (EA) y está claramente asociado a la edad, siendo rara en menores de 50 años y aumentando hasta un 4% a edad avanzada ^[3]. La edad media del

diagnóstico se sitúa en torno a los 60 años y la esperanza media de vida tras el diagnóstico es de unos 15 años. Se suelen considerar casos juveniles aquellos con una edad de inicio <20 años, y casos de inicio temprano a los de menos de 50 años (o <40 según otros criterios). Aunque los resultados son conflictivos, la incidencia podría ser menor en poblaciones asiáticas y negras. Los varones tendrían un riesgo mayor (OR=1,5), lo que podría deberse a un efecto neuroprotector de los estrógenos. En España se estima que hay unos 300.000 pacientes, con una prevalencia mayor en hombres (entre 1,2 y 1,7). A pesar del gran número de genes que se han descrito asociados a la enfermedad, se estima que los casos de EP monogénicos (de herencia mendeliana por mutaciones en genes concretos) representarían el 10-15% del total, siendo la mayoría de los casos de naturaleza idiopática esporádica.

1.2. Signos motores y no motores de la enfermedad

Los síntomas y signos de la enfermedad aparecen de manera tardía, cuando más del 60% de las neuronas dopaminérgicas (ND) de la *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) han muerto y se ha reducido drásticamente la inyección de dopamina en el estriado ^[4]. La fatiga, pérdida de la destreza, disfunción olfatoria, cambio en la escritura y cierta rigidez suelen ser síntomas que preceden al diagnóstico, aunque no suelen suscitar sospechas en el paciente. Los signos de la enfermedad pueden dividirse en dos categorías: motores y no motores, siendo los primeros los más conocidos y fáciles de reconocer en el paciente.

Los **signos motores** son cuatro:

- **Bradiquinesia:** lentitud en la realización de movimientos voluntarios y dificultad para llevarlos a cabo, puede desembocar en aquinesia o completa inmovilización. Es un signo bastante común en los pacientes y se manifiesta en la pérdida de expresión facial, arrastre de los pies al andar, pérdida del balanceo de los brazos o reducción de la modulación de la voz.
- **Temblor:** el temblor en reposo con una frecuencia 4-6 Hz, es el signo más conocido. Es

un temblor involuntario y rítmico que puede darse en una extremidad, en la cabeza o en todo el cuerpo. Normalmente afecta a uno de los hemisferios corporales y aunque es frecuente, no todos los pacientes lo manifiestan (80-90%); en pacientes con temblor dominante, la progresión suele ser más lenta. También se da temblor postural, desapareciendo unos segundos el temblor en reposo cuando al paciente toma posición y reemergiendo de nuevo. El temblor es común a otras enfermedades como el Temblor esencial.

- Rigidez: la rigidez muscular suele comenzar a manifestarse como agarrotamiento de los músculos del cuello y las piernas, es común a la mayoría de pacientes y suele ocasionar dolor.
- Inestabilidad postural: se debe a un trastorno en el equilibrio y pérdida de coordinación, con frecuencia ocasiona caídas y se manifiesta en un encorvamiento del cuerpo, hombros caídos y cabeza inclinada. Debe excluirse como causa una disfunción visual, cerebelar o propiceptiva.

Los **signos no motores** más comunes, son los siguientes:

- Disfunción olfatoria: los pacientes suelen perder capacidad olfatoria en los estadios preclínicos de la enfermedad, se da en un 70-100% de los casos y no suele ser percibida por el paciente. Suele estar ausente en los casos de EP debida a mutaciones en el gen *LRRK2* y es común a otras enfermedades como la DCL.
- Demencia: la prevalencia es del 10-40% y se incrementa con la edad y la severidad de la aquinesia/rigidez. Se ha descrito que los pacientes con demencia presentan una edad de inicio más tardía que los casos en los que no se manifiesta. El daño en la SNpc, núcleos basales de Meynert, locus coeruleus y corteza límbica contribuye al desarrollo demencia.

- Complicaciones psiquiátricas: pueden darse síntomas psicóticos en casos avanzados y tratados de manera crónica y debido a la medicación pueden aparecer alucinaciones visuales (30%), auditivas (10%) y táctiles (8%).
- Depresión: puede darse en cualquier momento de la enfermedad, varía en un ratio entre el 3-90% y se correlaciona con un estadio avanzado de la enfermedad, ansiedad, rasgos psicóticos y deterioro cognitivo.
- Ansiedad, impulsividad, comportamientos compulsivos, desordenes del sueño o disfunción eréctil son otros de los síntomas no motores que pueden acompañar a la enfermedad.

1.3. Criterios de diagnóstico clínico y técnicas de neuroimagen

El diagnóstico clínico es especialmente difícil en los primeros estadios, ya que los primeros signos claros de la enfermedad pueden aparecer tras meses o años. El criterio actual se basa en la presencia de bradiquinesia y al menos uno de los otros tres signos motores, la ausencia de factores causantes de parkinsonismo y una buena respuesta al tratamiento con levodopa (**Tabla 1**). Estos criterios de diagnóstico están definidos por el *UK Parkinson's Disease Brain Bank* (UKPDBD) y derivan de un estudio de autopsias de 100 casos con diagnóstico definitivo de EP [5-6]. Calne y cols. en 1992 definieron también unos criterios de diagnóstico con los mismos signos cardinales que el UKPDBB pero dando una importancia adicional a la presencia de asimetría [7].

Una vez cumplidos los criterios básicos (Paso 1) se deben excluir una serie de trastornos que pueden causar también parkinsonismo (Paso 2). Entre otros, habría que descartar la existencia de:

- Temblor esencial: hasta diez veces más común que la EP, afecta por igual a hombres y mujeres, no suele cursar con temblor en reposo y la frecuencia del temblor es de 4-12 Hz.

- Parkinsonismo inducido por drogas: fundamentalmente anti-psicóticos, que bloquean los receptores post-sinápticos de dopamina. La sintomatología se parece a la de EP esporádica, pero si se retira el medicamento los síntomas cesan.
- Parkinsonismo vascular: por infarto en los ganglios basales o isquemia en la materia blanca subcortical. Se diferencia por la ausencia de temblor y una menor respuesta a Levodopa.
- Atrofia multisistémica (AMS): combinación de parkinsonismo, disfunción autonómica y atributos cerebelares por muerte celular en diferentes áreas del cerebro; la edad media de inicio es algo menor que en EP.
- Parálisis supranuclear progresiva (PSP): pérdida celular en múltiples regiones cerebrales y tronco del encéfalo; la causa es desconocida.
- Demencia con Cuerpos de Lewy (DCL): la demencia y el parkinsonismo se dan prácticamente a la vez mientras que en la EP el parkinsonismo es previo.

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de la EP según el UKPDBB.

<p>Step 1: Diagnosis of Parkinsonism</p> <p>Bradykinesia and at least one of the following:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muscular rigidity • 4–6 Hz resting tremor • postural instability not caused by primary visual, vestibular, cerebellar or Proprioceptive dysfunction
<p>Step 2: Features tending to exclude Parkinson's disease as the cause of Parkinsonism</p> <ul style="list-style-type: none"> • History of repeated strokes with stepwise progression of parkinsonian features • History of repeated head injury • History of definite encephalitis • Neuroleptic treatment at onset of symptoms • >1 affected relatives • Sustained remission • Strictly unilateral features after 3 years • Supranuclear gaze palsy • Cerebellar signs • Early severe autonomic involvement • Early severe dementia with disturbances of memory, language and praxis • Babinski's sign • Presence of a cerebral tumour or communicating hydrocephalus on computed tomography scan • Negative response to large doses of levodopa (if malabsorption excluded) • MPTP exposure
<p>Step 3: Features that support a diagnosis of Parkinson's disease (three or more required for diagnosis of definite Parkinson's disease)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Unilateral onset • Rest tremor present • Progressive disorder • Persistent asymmetry affecting the side of onset most • Excellent (70–100%) response to levodopa • Severe levodopa-induced chorea • Levodopa response for ≥ 5 years • Clinical course of ≥ 10 years

En cuanto a las **técnicas de neuroimagen**, pueden ser un apoyo a la hora de distinguir la EP de estas enfermedades neurodegenerativas con síntomas similares. La Tomografía axial computarizada y la Resonancia magnética permitirían excluir parkinsonismos secundarios cuando hay datos clínicos atípicos. La Sonografía tras craneal se emplea para la identificación precoz y el diagnóstico diferencial con parkinsonismos atípicos como AMS y PSP. La tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) y la de emisión de positrones (PET) permiten estudiar el estado de la vía dopaminérgica nigroestriatal mediante el uso de radioligandos. El más utilizado es el DaTSCAN que usa ^{123}I -ioflupano, que interviene en la captación de dopamina en la hendidura sináptica y estima la densidad del transportador de dopamina en el estriado. Ayuda a diferenciar la EP de AMS, PSP y parkinsonismo inducido por drogas.

1.4. Tratamiento farmacológico y quirúrgico

Actualmente no hay ningún tratamiento neuroprotector, el tratamiento farmacológico actual es paliativo. Dada la naturaleza progresiva de la enfermedad, suele ser necesario optimizar el tratamiento a lo largo del tiempo. La bradiquinesia y la rigidez son los síntomas que mejor responden al tratamiento, mientras que la respuesta del temblor es muy variable entre pacientes y la inestabilidad postural es la de peor respuesta. Los fármacos más empleados son:

- La levodopa, que es un sustituyente de la dopamina endógena, revolucionó la terapia de la EP tras su introducción en la década de 1970 y sigue siendo el fármaco más efectivo ^[8]. Se trata de suplir el déficit natural de L-DOPA asociado al desarrollo de la enfermedad (**Figura 1**). Conlleva efectos secundarios como náuseas y mareos, por lo que se administra acompañado de inhibidores de la decarboxilasa. Con el tiempo el 20-25% de los pacientes sufren fluctuaciones motoras o de periodos en los que la medicación está haciendo efecto y periodos en los que no, lo que conlleva que haya que aumentar la dosis y frecuencia de administración,

ocasionando un aumento de los efectos secundarios, entre ellos las discinesias o movimientos involuntarios.

- Los inhibidores de la catecol-O-metil transferasa (COMT), que disminuyen la conversión de la dopamina a 3-metil-O-dopa (3-OMD) incrementando así la vida media de la levodopa. El Stalevo combina el inhibidor de la COMT (entacapone) con levodopa y carbidopa.
- Los agonistas de la dopamina, que ejercen una acción directa sobre los terminales post-sinápticos de dopamina y pueden emplearse como monoterapia al principio de la enfermedad o como adyuvante en fases avanzadas.
- Los inhibidores de la monoamin oxidasa B (MAO-B), que previenen la degradación de la dopamina y su reabsorción en el terminal sináptico.

Cuando el tratamiento farmacológico deja de dar el resultado deseado y las discinesias son muy frecuentes, el paciente puede ser candidato a alguno de los tratamientos quirúrgicos. Entre ellos, la estimulación cerebral profunda, consistente en implantar un generador de pulso conectado por un cable a unos electrodos implantados en el globo pálido, tálamo o núcleo subtalámico; al recibir el pulso se inhibe la sobreactividad neuronal que conlleva la enfermedad. Tiene numerosas ventajas, siendo la principal que no se daña el tejido cerebral, que se pueden ajustar los pulsos, o que si en un futuro se encontrara otra terapia se pueden retirar los electrodos.

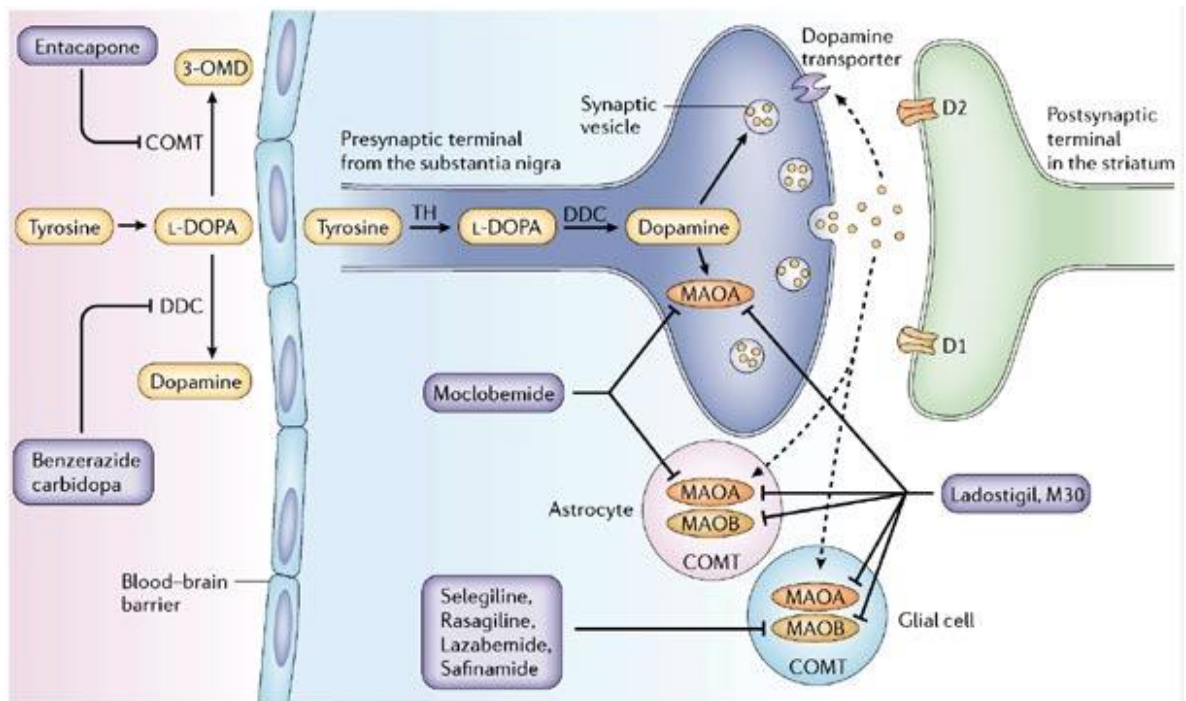


Figura 1. Metabolismo de la dopamina y mecanismos de actuación de los diferentes fármacos. Tomada de Youdim y cols. 2006 ^[9]

1.5. Neuropatología de la Enfermedad de Parkinson

Los signos motores que acompañan a la enfermedad son debidos a la pérdida de neuronas dopaminérgicas (ND) en la *pars compacta* de la *Sustantia nigra* (SNpc) y a la consiguiente disminución de los niveles de dopamina en el estriado. Aunque estudios previos ya apuntaban al papel de la degeneración de la SN en la enfermedad, fue Carlsson en 1959 quien describió el papel de las catecolaminas como neurotransmisores e indicó que alrededor del 80% de la dopamina se encuentra en el estriado; mientras que Hornykiewicz describió posteriormente la gran disminución de dopamina en el estriado de los pacientes con EP ^[10-11].

La SN forma parte del circuito de los ganglios basales (GB), que son clave en el sistema motor, y está compuesto por el estriado (formado por el núcleo caudado y el

putamen), el globo pálido (GP), el núcleo subtalámico (NST) y la SN compacta y reticular. Se han descrito dos circuitos principales de transmisión de la información: directo e indirecto. La vía directa es monosináptica y conecta el putamen con el GP interno y la SN reticular facilitando el movimiento, usa como neurotransmisores el GABA, sustancia P y dinorfina. La vía indirecta va del putamen al GP externo, de éste al NST y del NST al GP interno y SN reticular, usando GABA y encefalinas como neurotransmisores; su acción final sería inhibir el movimiento. Los receptores dopaminérgicos asociados a la vía directa son de tipo D1 y los de la indirecta de tipo D2. La dopamina es excitatoria sobre las neuronas con receptores D1 e inhibitoria sobre las que poseen receptores D2; este balance de excitación-inhibición permite que los GB realicen su función y las conductas y movimientos se lleven a cabo de manera eficaz. La carencia de dopamina producida por la disminución de las ND en la SNpc trastorna este funcionamiento y da lugar al temblor, rigidez y bradiquinesia característicos de la EP (**Figura 2**).

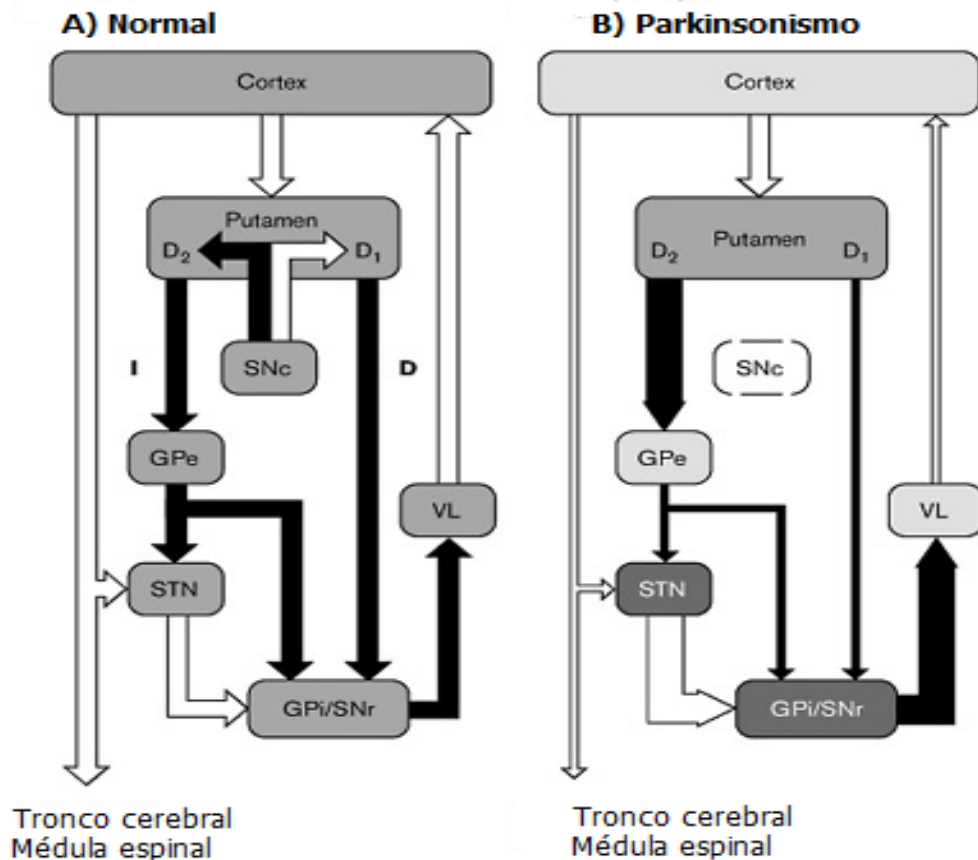


Figura 2. Conectividad de los Gánglios basales y circuitos Tálamo-corticales según el modelo propuesto por Bergman y cols. 1999 ^[12].

Abreviaturas: I, indirecta; D, directa; SNc, Sustantia nigra pars compacta, SNr, Sustantia nigra pars reticulata; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno, STN, núcleo subtalámico; VL, tálamo ventral.

1.6. Anatomía Patológica de la Enfermedad de Parkinson

A nivel celular, la EP se caracteriza por unas inclusiones proteicas en el citoplasma conocidas como Cuerpos de Lewy (CL), filamentos proteicos y presencia de neuritas aberrantes o neuritas de Lewy (NL) en la SN. Posteriormente, como mecanismo

adaptativo, se producen cambios en el tálamo, subtálamo, globo pálido y SN *pars reticularis* [13-14]. Los CL y NL son eosinófilos y su núcleo y halo periférico son reconocibles con tinción hematoxilina-eosina (**Figura 3**). Normalmente se localizan en el citoplasma de las neuronas en la SN y LC, y como formas alargadas en los Núcleos basales de Meynert, núcleos del vago o hipotálamo. Pueden contener neuromelanina, lipofuscina, mitocondrias, gránulos electrón-densos, polisacáridos, ácidos grasos, etc, pero el elemento más importante es su citoesqueleto de neurofilamentos proteicos alterados por fosforilación, ubiquitinización, truncación, nitración y proteólisis. Los principales componentes son la α -synucleína y la ubiquitina, y en menor medida parkina y synphilina [15].

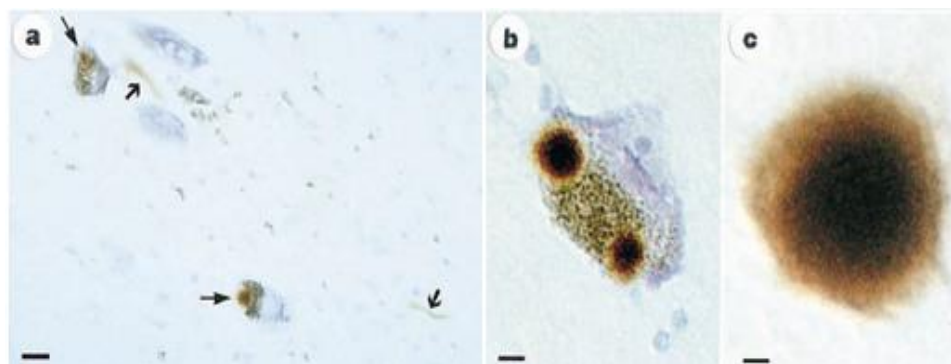


Figura 3. *Substantia nigra* de pacientes con EP. A) Neuronas pigmentadas con inclusiones de CL y NL (flechas). B) Neurona con dos CL en el citoplasma. C) CL extracelular. Imagen tomada de Spillantini y cols. [15].

Se ha visto que la proporción de CL en las neuronas de la SN es constante en todos los estadios de la enfermedad (alrededor del 3-4%) y se cree que se forman durante el transcurso de la enfermedad y cuando la célula muere desaparecen. Aún no está claro su papel neurotóxico o neuroprotector, si generan toxicidad al impedir que otras proteínas realicen su función, o si aíslan a las proteínas tóxicas del resto de componentes celulares.

El estudio sistemático de cerebros de pacientes que presentaban patología de CL llevó a la necesidad de crear una clasificación patológica, compuesta por 6 estadios progresivos conocidos como **Estadios de Braak (Figura 4)** [16-18].

- Estadio 1: presencia de CL y neuritas en los núcleos dorsales motores IX/X y/o zona reticular intermedia, plexo mientérico o de Auerbach afectado.
- Estadio 2: afectación de la médula oblonga y tegumento pontino, núcleo caudal del rafe, núcleo reticular gigantocelular y locus coeruleus; disfunción del bulbo olfatorio.
- Estadio 3: se suman las lesiones en el mesencéfalo, en concreto en la SNpc.
- Estadio 4: se extiende al prosencéfalo y mesocortex.
- Estadio 5: se extiende a las áreas sensoriales del neocórtex y neocórtex prefrontal.
- Estadio 6: lesiones severas en las áreas sensoriales del neocórtex y áreas pre-motoras, ocasionalmente cambios leves en áreas sensoriales primarias y campo motor primario.

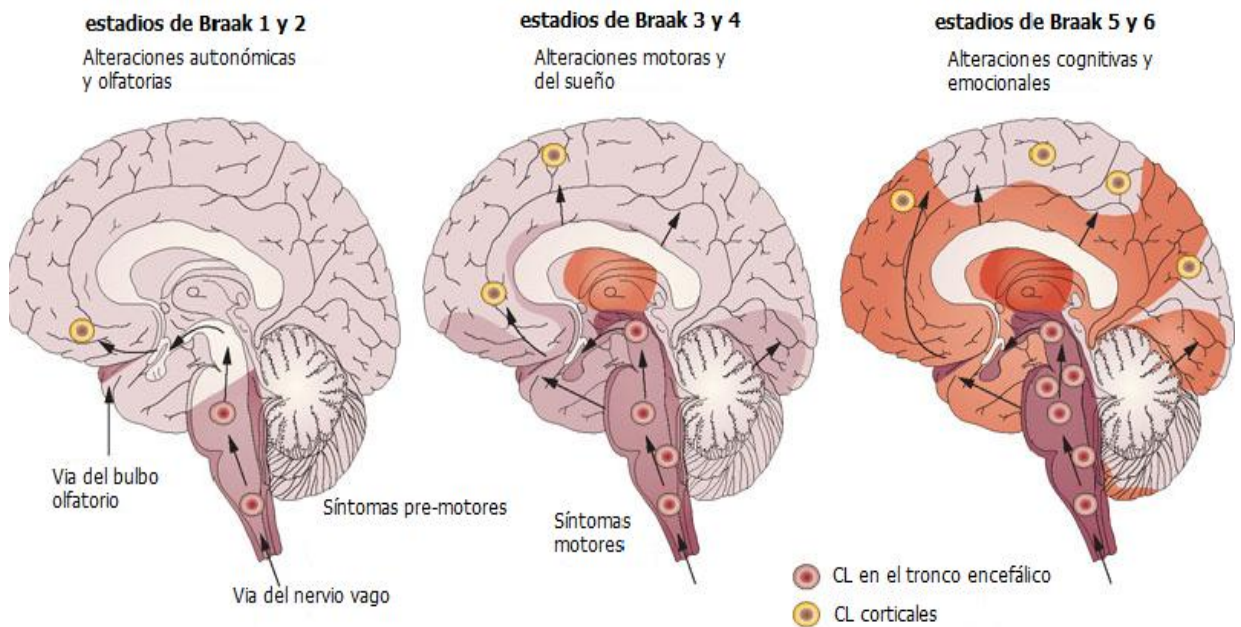


Figura 4. Progresión de la afectación cerebral según los estadios de Braak y alteraciones relacionadas. Modificada de Halliday y cols. ^[19]

2. Genética de la Enfermedad de Parkinson

Hasta 1997 se pensaba que la causa de la EP era exclusivamente ambiental. La idea surgió tras la epidemia de parkinsonismo postencefálico después de la Primera Guerra Mundial y tras el descubrimiento del parkinsonismo inducido por MPTP. Sin embargo, también había casos familiares con varios miembros afectados y una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad si había antecedentes familiares de la misma. En 1997 se descubrió la primera mutación en el gen *SNCA*, y desde entonces se han descrito 16 genes relacionados con la EP y varios loci candidatos aún no confirmados (**Tabla 2**) ^[20]. Los casos de EP de tipo monogénico o de herencia mendeliana supondrían el 10-15% del total, mientras que el 90% restante son casos esporádicos con componente de riesgo genético y ambiental.

Tabla 2. Loci y genes asociados con la Enfermedad de Parkinson

Loci	Cromosoma	Gen	Herencia/EI	Función
VALIDADOS PARK1/4	4q21	<i>SNCA</i>	AD/temprano	Papel en la sinapsis y reciclaje de vesículas sinápticas, chaperona molecular y función antiapoptótica.
PARK8	12q12	<i>LRRK2</i>	AD/tardío	Regulación vesículas sinápticas, autofagia, respuesta al estrés oxidativo, interacción con proteínas del citoesqueleto.
PARK2	6q25.2–q27	<i>Parkin</i>	AR/temprano	Ubiquitin E3 ligasa, marca proteínas para degradación por el complejo Ubiquitina-Proteasoma. Mantenimiento de la función mitocondrial.
PARK6	1p35-36	<i>PINK1</i>	AR/temprano	Serín-treonín proteína kinasa, respuesta mitocondrial al estrés oxidativo.
PARK7	1p36	<i>DJ-1</i>	AR/temprano	Chaperona mitocondrial, protección estrés oxidativo. Interacciona con Parkina y PINK1 en la ubiquitinización.
PARK9	1p36	<i>ATP13A2</i>	AR/juvenil	ATPasa asociada a función lisosomal. Síndrome Kufor-Rakeb.

SIN CONFIRMAR				
PARK5	4p13	<i>UCHL1</i>	AD/tardío	Interviene en la formación de los monómeros de ubiquitina.
PARK11	2q37.1	<i>GIGYF2</i>	AD/tardío	
PARK13	2p12	<i>OMI/ HTRA2</i>	AD/?	Implicación en la apoptosis? función mitocondrial?
PARK14	22q13.1	<i>PLA2G6</i>	AR/juvenil	Fosfolipasa A2 grupo6, asociada a neurodegeneración con acumulación de hierro.
PARK15	22q11.2-qter	<i>FBXO7</i>	AR/temprano	Se cree que interviene en la formación de los complejos ubiquitina-ligasa.
PARK3	2p13	<i>SPR?</i>		
PARK10	1p32	?	?/tardío	
PARK12	Xq21-q25	?	Ligada al X	
PARK16	1q32	?	?	
PARK17	16q11.2	<i>VPS35</i>	AD/tardío	Transporte retrógrado de vesículas sinápticas.
PARK18	3q27.1	<i>EIF4G1</i>	AD/tardío	Factor eucariótico implicado en la traducción.
PARK19		<i>DNAJC6</i>	AR/juvenil	Auxilina, reciclaje post-endocítico de las vesículas sinápticas.
PARK20		<i>SYNJ1</i>	AR/juvenil-temprano	Sinaptojanina1, reciclaje post-endocítico de las vesículas sinápticas.
OTROS	1q22	<i>GBA</i>	AD/tardío	Enzima lisosomal. Enfermedad de Gaucher.
	17q21.31	<i>MAPT</i>		Proteína tau asociada a microtúbulos.

AD= autosómica dominante, AR= autosómica recesiva, EI=edad de inicio

En las formas mendelianas, causadas por mutaciones en alguno de los genes implicados en la EP, la herencia puede ser dominante o recesiva, y la penetrancia de la mayoría de las mutaciones es variable. Por otro lado, genes como *LRRK2* o *SNCA* que tienen mutaciones que dan lugar a formas monogénicas de la enfermedad, contendrían también variantes de riesgo presentes en la población general. Aparte, variantes en los genes *GBA* (asociado a enfermedad de Gaucher) y *MAPT* (asociado a demencia

INTRODUCCIÓN

frontotemporal) serían factores de susceptibilidad para la EP. En la EP, intervienen numerosos procesos fisiológicos y celulares y son varios los mecanismos de interacción entre los diferentes genes, en la **Figura 5** se presentan esquemáticamente estas interacciones.

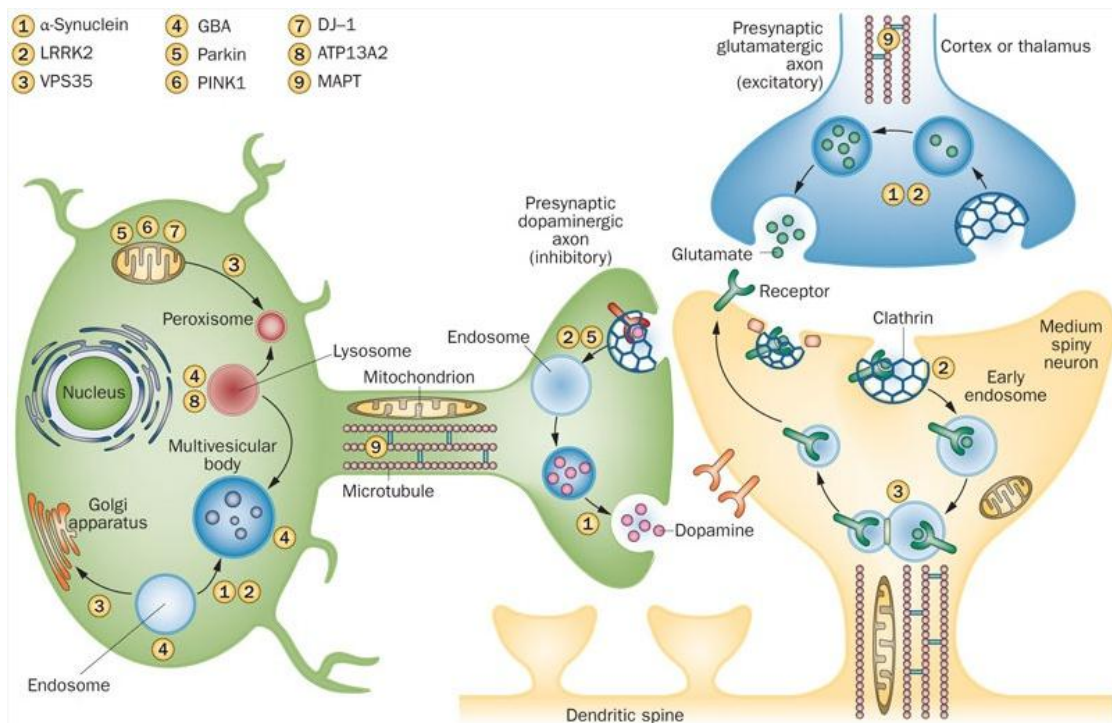


Figura 5. Interacción a nivel neuronal de los genes asociados a EP y mecanismos celulares relacionados. Figura tomada de Trinh y Farrer 2013 ^[21].

Dado que nuestro estudio se ha centrado en la genética de los genes *SNCA* y *LRRK2*, nos centraremos en aspectos relacionados con éstos.

2.1. SNCA (PARK1/4)

El primer locus asociado a la EP (PARK1) fue identificado en 1996 en una familia norteamericana de origen italiano, con ligamiento de la enfermedad a la región cromosómica 4q21-23. Un año más tarde se identificó la mutación puntual p.A53T en el gen *SNCA* que codifica la proteína α -synucleína (α -syn) [20, 22]. Posteriormente se identificaron las mutaciones p.A30P en una familia alemana y p.E46K en familias vascas [23-24]. Además de mutaciones puntuales, se dan casos de reordenamientos génicos, tanto duplicaciones como triplicaciones de *SNCA*. Las mutaciones en este gen son una causa poco frecuente de EP y se hallan en casos con inicio temprano. Recientemente se han descrito dos mutaciones puntuales nuevas en este gen: p.H50Q en dos casos con herencia inglesa y p.G51D en 5 casos franceses e ingleses [25-28]. La patología cerebral causada por *SNCA* cursa con presencia de abundantes CL y NL y la clínica es variable, desde fenotipo clásico a atípico y agresivo.

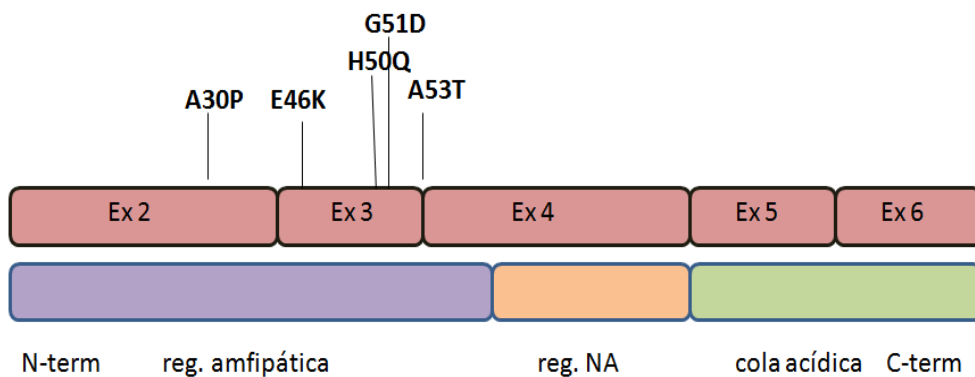


Figura 6. Dominios funcionales de la α -synucleína y localización de las mutaciones puntuales.

Función de la α -syn y patología asociada

La α -syn tiene 140 aminoácidos pertenece a una familia compuesta por tres miembros: α -, β - y γ -synucleína y sólo se encuentra en vertebrados. Tiene dominios N-terminal (aminoácidos 1-60), C-terminal (96-140) y central (61-95); siendo este último el componente no-amiloide β de la placa (NACP) responsable de que pueda cambiar de conformación espiral a hoja β y formar fibrillas. La acumulación patológica de α -syn por plegamiento anómalo (por ejemplo debido a las mutaciones puntuales) causa una disfunción y muerte características de la patogénesis de la EP. Aunque el papel de α -syn no está del todo claro se la ha relacionado con numerosas funciones, entre ellas:

- La presencia de α -syn en el núcleo y en los terminales sinápticos cerebrales sugiere un papel en la sinapsis y reciclaje de las vesículas sinápticas ^[29]. El transporte de dopamina y la regulación de la actividad del enzima tirosina-hidroxilasa estarían alterados en los mutantes α -syn.
- Podría tener un papel antiapoptótico y fomentar la supervivencia neuronal, en parte mediado por su capacidad para reducir la actividad de la ruta de p53 ^[30].
- Por su estructura podría actuar como chaperona molecular ^[31].

Actualmente hay dos hipótesis enfrentadas acerca de la neurotoxicidad o neuroprotección de la α -syn: ¿los agregados proteicos en los CL protegen a la célula de la toxicidad de la acumulación de la proteína, o son precisamente estas inclusiones las que acaban promoviendo la muerte celular? Así mismo, se ha demostrado que la α -syn se puede transferir de célula a célula en un mecanismo similar al de los priones, lo que explicaría los estadios de propagación de la enfermedad, descritos por Braak, y la presencia de CL varios años después del trasplante en los pacientes sometidos a terapia celular.

En cuanto a los mecanismos que podrían fomentar la agregación, se han propuesto la fosforilación (en las serinas 129 y 87), la nitración y la oxidación. Por otro lado, el ajuste

alternativo del pre-ARN mensajero resultaría en transcritos de ARNm de diferentes tamaños, y algunos de ellos codificarían isoformas con mayor tendencia a la agregación: α -syn-112 (carente del exón 5) y α -syn-98 (carente de los exones 3 y 5).

2.2. *LRRK2* (PARK8)

El gen *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase-2*) es el más frecuentemente mutado en la EP, tanto casos familiares como esporádicos. El locus PARK8 se localizó en la región cromosómica 12q12 sobre una familia japonesa en el año 2002, y posteriormente se identificaron mutaciones en el gen *LRRK2* en esta y otras familias ^[32-33]. El gen consta de 51 exones y codifica la proteína dardarina, compuesta por 2527 aminoácidos y 7 dominios, de los cuales 3 son catalíticos (ROC-GTPase, COR y kinasa) y 4 contienen motivos repetitivos (armadillo, ankyrin, leucine-rich repeat y WD40). Se han descrito más de 100 mutaciones, pero sólo se ha demostrado la patogenicidad de p.N1437H, p.R1441C, p.R1441G, p.R1441H, p.Y1699C, p.S1761R, p.I2012T, p.G2019S y p.I2020T, todas situadas en los dominios catalíticos (**Figura 7**).

La mutación p.G2019S es la más frecuente en pacientes con EP de varias poblaciones. El porcentaje de portadores es elevado en algunas regiones, con máximos en árabes bereberes (28%), judíos Askenazíes (42%) y portugueses (16%); en España, se ha descrito que hasta un 5.1% de los pacientes serían portadores y en Europa entre un 1-7% ^[34-37]. La penetrancia de esta mutación varía según las poblaciones, y se ha calculado en un 30-60% a la edad de 80 años en población europea. La variante p.R1441G tiene su origen en el País Vasco y es más frecuente en el norte de España, con una frecuencia de hasta el 8% ^[38]. La mutación p.R1441C es la segunda más frecuente en Europa, y habría surgido en la población belga ^[39]. La penetrancia de éstas dos mutaciones es variable y se correlaciona con la edad, siendo de un 17% a los 50 años y de hasta un 85% a los 70 años ^[40].

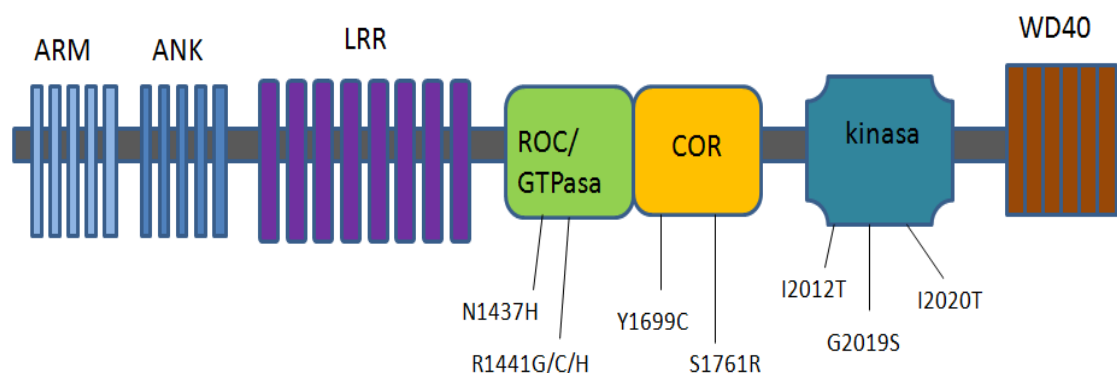


Figura 7. Mapa del gen *LRRK2* mostrando los dominios funcionales de la proteína y la posición de las mutaciones asociadas a la enfermedad. Abreviaturas: ARM, Armadillo; ANK, Ankiryn; LRR, Leucine-rich repeat; ROC, Ras of complex proteins; COR, C-terminal of Roc.

Función de *Irrk2* y patología asociada

A pesar de que la patología asociada a las mutaciones en *LRRK2* se suele considerar típica degeneración en la SN, el análisis neuropatológico *postmortem* de pacientes portadores de mutaciones en este gen sugiere que hay una gran heterogeneidad [41]. Aunque *Irrk2* no es un componente de los CL, generalmente se asocia su disfunción a la presencia de CL y NL, y a la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, no es así en todos los casos y una misma mutación puede causar una patología variada.

La proteína *Irrk2* o dardarina es un enzima multidominio con actividad kinasa y GTPasa, que se engloba generalmente dentro de la familia de proteínas ROC (*Ras of complex domain*) [42]. El hecho de combinar dos actividades enzimáticas la hace rara y atractiva, pero también complica el entendimiento de su papel en la enfermedad. Los dominios kinasa y GTPasa están separados por un dominio de función desconocida, el dominio C-terminal de ROC (COR). Mayoritariamente se cree que se encuentra en forma monomérica con baja actividad en el citosol, y en forma multimérica con mayor actividad asociada a membranas [43]. Estudios recientes sugieren que la actividad kinasa de *Irrk2* es dependiente de que haya un nucleótido guanosina de cualquier tipo en el sitio activo del

dominio ROC ^[44]. La pérdida del dominio WD40 o de parte de los aminoácidos del dominio C-terminal da lugar a una pérdida de la actividad kinasa. Debido a su actividad fosforilasa, se la ha relacionado con vías de señalización como mTOR, WNT, o ERK; sin embargo, aún no se ha validado su sustrato. Así mismo, se la ha relacionado con los siguientes procesos:

- Regulación de las vesículas sinápticas por interacción con las endofilinas.
- Autofagia mediada por chaperonas.
- Cascadas de señalización en respuesta al estrés celular.
- Regulación de miRNAs a través de let7 y miR184.
- Interacción con proteínas del citoesqueleto.
- Respuesta a patógenos e interferón gamma.

Así mismo, también ha sido relacionada con la enfermedad de Crohn y la lepra, sugiriendo un papel en la respuesta inmune.

Tanto las variantes con ganancia de función (dominio kinasa) como pérdida de función (dominio COR-ROC) se han asociado con la EP. Sin embargo, el mecanismo no está claro ya que las variantes p.R1441G/C y p.Y1699C se han asociado a una disminución de la actividad GTPasa, mientras que p.G2019S se ha asociado a un aumento de la actividad kinasa y disminución de la GTPasa; sin embargo, p.I2012T y p.I2020T están también en el dominio kinasa y no se han relacionado con cambios en la actividad, mientras que el polimorfismo de riesgo en asiáticos p.G2385R conllevaría un descenso de la actividad kinasa ^[45-48]. Todo ello sugiere que es la desregulación de la actividad enzimática lo que conduce hacia la enfermedad con independencia de la naturaleza del cambio.

2.5. SNCA y LRRK2 en la Enfermedad de Parkinson esporádica

La EP esporádica representa la mayoría de los casos, hasta un 90% del total. Tiene un origen multifactorial, con el riesgo definido por la combinación de factores genéticos y ambientales ^[49]. Desde el punto de vista clínico, la EP esporádica se clasifica en tres

subtipos con diferente severidad y progresión; temblor dominante, acinético-rígido y mixto. Los genes *SNCA* y *LRRK2*, ambos relacionados inicialmente con formas familiares de EP de herencia dominante, han sido también relacionados con el riesgo de EP esporádico, entre otros mediante estudios de asociación del genoma completo (GWAS) comparando pacientes y controles.

En cuanto a *SNCA*, tanto variantes en la región 5' (microsatélite REP1) como en la 3' no traducida (rs11931074, rs356165, rs356219) se han asociado al riesgo de EP en estudios caso-control en poblaciones con ancestros europeos y asiáticos, con una OR entre 1.2 y 1.4 ^[50-51]. La variante p.G2019S del *LRRK2* ha sido hallada en el 1-2% de los casos con EP esporádico, y en los asiáticos p.R1628P y p.G2385R se han relacionado con el riesgo de desarrollar la enfermedad ^[52-54].

2.6 Factores de riesgo (FR) y protección (FP) asociados a la enfermedad

El principal y único FR globalmente reconocido es la edad, estando el riesgo de padecer la enfermedad directamente relacionado con incremento de la edad. Los antecedentes familiares suelen aceptarse como el segundo FR más importante, aunque en el 90% de casos no se encuentra la causa de la enfermedad. La exposición a toxinas ambientales se considera un FR desde que en 1983 varias personas desarrollaron síntomas de parkinsonismo tras inyección intravenosa de drogas contaminadas por MPTP y el hallazgo posterior de que esta sustancia mataba selectivamente neuronas dopaminérgicas ^[55]. El MPTP junto con el herbicida paraquat y el pesticida rotenona han sido demostrados inhibidores del Complejo I de la mitocondria, lo cual junto con el encuentro en pacientes de EP de déficit en el funcionamiento de este complejo, los hace potenciales FR para el desarrollo de la enfermedad ^[56]. La exposición a metales pesados, el trabajo como soldador y el trabajo en el campo se barajan como FR, pero los resultados aún no son concluyentes.

Los principales FP asociados con la EP son el consumo de tabaco y café, con un riesgo relativo (RR) de 0,39 para fumadores crónicos y 0,69 para consumidores de café [57]. Esto se debe a que los componentes activos cafeína y nicotina, actúan a nivel de la ruta dopaminérgica alterando la actividad del enzima MAO-B en el caso de la nicotina e inhibiendo al receptor de la Adenosina A₂ en el caso de la cafeína [58-59]. Otros FP descritos son la vitamina E, donde un alto consumo se ha asociado en algunos estudios a un menor riesgo de EP y el efecto antioxidante de los estrógenos que se cree que podría proteger ante la muerte neuronal.

3. MicroRNAs (miRNAs)

Los miRNAs son ARNs no codificantes (ARNnc) de unos 22-24 nt que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional uniéndose a los ARNm para promover su degradación o bloquear la síntesis proteica. El primer miRNA descrito fue lin-4 en *Caenorhabditis elegans*, en 1993, que está implicado en la regulación del desarrollo larval a través del gen lin-14 [60]. Sin embargo, no fue hasta el 2001 cuando el concepto de los miRNAs como elemento biológico tomó cuerpo y se estableció una clasificación de los mismos [61-63]. Actualmente, sabemos que regulan procesos del desarrollo, morfogénesis y la adaptación del organismo a cambios; estando su desregulación asociada a múltiples procesos patológicos, incluyendo los tumorales y los neurodegenerativos [61, 64-67].

3.1. MiRNAs: biogénesis y mecanismos de actuación

Los miRNAs están codificados en la secuencia de ADN intergénica, pero también en intrones y algunos incluso en los exones y regiones reguladoras; en estos casos, su expresión puede estar regulada por el promotor del gen hospedador. La primera etapa en la síntesis de un miRNA es la síntesis de una hebra de ARN, conocida como pri-miRNA, por las ARN polimerasas II o III. El pri-miRNA es procesado por un complejo (Microprocesador)

formado por una ribonucleasa III conocida como Drosha y la proteína de unión al ARN DGCR8 o Pasha, generándose una cadena de ARN más corta (de 60 a 100 nucleótidos) con una estructura en horquilla conocida como pre-miRNA ^[68]. Este pre-miRNA es transportado a través de la membrana nuclear por la exportina-5, a través de un mecanismo dependiente de GTP (**Figura 8**). Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por Dicer (una RNase III) y la proteína loquaceous, resultando una doble hebra corta miRNA:miRNA* ^[69]. Sólo una de las dos hebras (la guía) se incorporará al complejo RISC (complejo inductor del silenciamiento del ARN) ^[70]. Normalmente, hay una preferencia sobre qué hebra va a ser el miRNA funcional y la otra hebra es degradada, aunque en algunos casos ambas pueden incorporarse al RISC. Dentro del RISC el miRNA reconocerá sus ARNm diana por complementariedad de algunos nucleótidos (la región semilla del miRNA), promoviendo la represión de la síntesis proteica ^[71]. La mayoría de las regiones diana se encuentran en las secuencias 3' no traducibles (3'UTR) de los ARNm, si la complementariedad es completa la unión puede resultar en la degradación total del ARNm. Una característica del proceso es que un miRNA puede reconocer y regular varios ARNm, y cada ARNm contendría dianas para varios miRNAs ^[72].

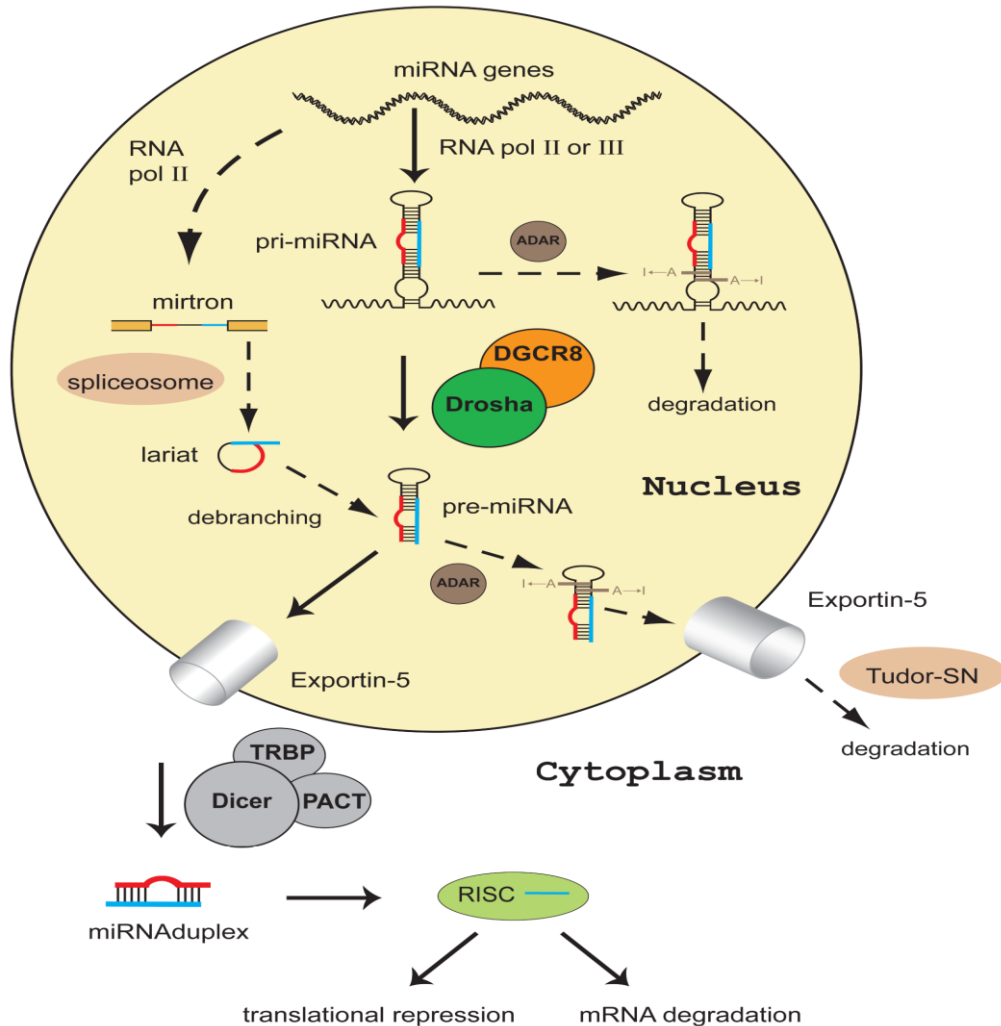


Figura 8. Biogénesis de los miRNAs (tomada de Faller y Guo 2008) ^[73]

La biogénesis de los miRNAs está regulada en cada una de sus etapas por numerosos factores, muchos de ellos los mismos que regulan la síntesis del ARN. Entre ellos destaca la edición por enzimas ADAR, adenosin-deaminasas que convierten las adeninas en inosinas. Este mecanismo afecta a los pri-miRNAs y pre-miRNAs e incrementaría la diversidad de los miRNAs. Otro proceso, es el control por mecanismos epigenéticos, se ha observado en varios tipos de tumores hipo o hipermetilación del ADN

en secuencias que codifican miRNAs. También se ha descrito modificación de histonas en promotores de miRNAs. Por último, la biogénesis de los miRNAs puede estar controlada a su vez por miRNAs que regulan la síntesis de las proteínas implicadas en el proceso, hasta el extremo en el que un miRNA podría regular su propia expresión.

3.2. MiRNAs y enfermedad de Parkinson

Los miRNAs juegan un papel fundamental en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, y su desregulación contribuye al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. El carácter fundamental de este proceso fue demostrado en varios estudios, como el que mostró el papel de Dicer en la morfogénesis del cerebro del pez cebra: los embriones con Dicer mutado no producen miRNAs maduros y tienen defectos en el sistema nervioso. Estas alteraciones pueden ser revertidas por la inyección de miR-430 [74]. MiR-134 está relacionado con la formación de las espinas dendríticas mientras que miR-124 y -132 se relacionaron con el crecimiento de las neuritas [75-77]. Los miRNAs relacionados con el ciclo celular y apoptosis también tienen un papel claro en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas.

El primer miRNA relacionado con la EP fue miR-133b, cuya expresión estaba reducida en el cerebro de pacientes con EP comparado con los controles. Este miRNA regularía al factor de crecimiento PITX3, implicado en la diferenciación y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, mediante una retroalimentación negativa [78]. El factor de crecimiento fibroblástico FGF20, que se expresa en la SN y estimula la maduración de las neuronas dopaminérgicas, es regulado por miR-433. Además, un polimorfismo (SNP rs12720208) en la región 3'UTR podría mitigar la afinidad del miRNA por el ARNm de FGF20, lo que resultaría en una sobreexpresión de esta y otras proteínas, como *SNCA* [79]. Sin embargo, miR-433 tiene una expresión muy reducida en el cerebro y su asociación con la EP mediada por *SNCA* ha sido refutada por algunos autores [80]. Varios estudios han demostrado la regulación del gen *SNCA* por los miRNAs miR-7 y miR-153, de forma aditiva [81-82]. En relación al gen *LRRK2*, Gehrke y cols. hallaron en *D. melanogaster* una interacción

con la ruta de biosíntesis de los miRNAs. Los genes E2F1 y DP, previamente implicados en el ciclo y supervivencia celulares, son reprimidos por los miRNAs let-7 y miR-184*, que son a su vez bloqueados por isoformas patogénicas de *Lrrk2*. Esta sobreproducción de E2F1 y DP sería un hecho muy relevante en la patogénesis mediada por *LRRK2* [83]. Recientemente, un estudio que analiza el perfil de expresión de miRNAs en el cerebro de pacientes con EP y donantes sanos, ha sugerido una infraexpresión de miR-34b/c en áreas cerebrales afectadas en fases tempranas de la enfermedad. Estos miRNAs podrían actuar sobre la función mitocondrial y el estrés oxidativo, a través de la disminución de la expresión de los genes DJ1 y Parkina [84].

Los estudios de expresión de miRNAs en sangre de pacientes con EP son escasos. Sin embargo, la detección de miRNAs circulantes está muy avanzada en los procesos tumorales, en los cuales podría ser importante como herramienta de diagnóstico o para la monitorización de los tratamientos. En todos los casos, el mecanismo de acción sería la liberación al plasma de miRNAs específicos o sobreexpresados en el tejido afectado. Un estudio ha sugerido que miR-1826/miR-450b-3p, miR-626, y miR-505 podrían diferenciar el plasma sanguíneo de pacientes con EP y sujetos sanos [85]. Por otro lado, se han descrito menores niveles de miR-29c, miR-29a y miR-19b en la sangre de pacientes con EP [86]. El perfil de expresión de miRNAs circulantes podría también variar con los tratamientos [87]. A pesar de estos resultados, las diferencias en la metodología empleada y la variabilidad clinicopatológica entre las muestras analizadas, además del tamaño muestral reducido, nos deben hacer tomar con cautela todos estos resultados.

3.3. MicroRNAs como terapia en enfermedades neurodegenerativas

Hay una gran expectativa alrededor de la posibilidad de tratar las enfermedades neurodegenerativas con ARNs que “imitan” el papel de los miRNAs. Las dos aproximaciones son el uso de miRNAs sintéticos dirigidos a regular la expresión de algunas proteínas o el uso de anti-miRNAs para bloquear un miRNA concreto [88]. Una de las

mayores limitaciones, es que desconocemos si estas moléculas exógenas tendrían una vida media demasiado baja y sería necesario inyectarlos de manera repetitiva. Además, tendrían que actuar sobre las células o regiones cerebrales concretas implicadas en la patología. Para lograr este objetivo se están empleando exosomas dirigidos a las células diana y que transportan el miRNA terapéutico ^[89]. El silenciamiento mediante anti-miRNAs se ha ensayado empleando conjugados de ARNs pequeños con moléculas de colesterol, que permiten el transporte a través de la sangre tras la inyección intravenosa ^[90]. Aunque estos complejos no pueden traspasar la barrera hematoencefálica, podrían ser inyectados directamente en el cerebro. Una tercera estrategia más reciente, es la captación de miRNAs mediante una “esponja” sintética de ARNm con dianas para los miRNAs de interés ^[91].

Aunque la aplicación en humanos de terapias relacionadas con los miRNAs puede estar aún lejana, los resultados obtenidos son esperanzadores y podrían ser importantes para el futuro tratamiento de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas.

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbn**Objetivos**uiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm
qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

OBJETIVOS

El objetivo general ha sido investigar la implicación de los miRNAs en la EP, analizando por un lado la variación de la región 3' UTR de los genes *SNCA* y *LRRK2* (que podría afectar a la unión de miRNAs) y por el otro, el perfil de expresión de miRNAs en el plasma y el tejido cerebral de pacientes con EP y sujetos sanos.

Como objetivos concretos, se plantearon los siguientes:

1. Estudiar la variación en la región 3'UTR de los genes *SNCA* y *LRRK2* con el objetivo de identificar variantes nucleotídicas de riesgo o protección frente a la EP.
2. Determinar si las variantes de riesgo podrían regular la expresión de los genes *SNCA* y *LRRK2* mediante la modificación de la unión de miRNAs concretos.
3. Determinar la relación de estas variantes de riesgo con los niveles de los transcritos de ambos genes en varias regiones cerebrales de pacientes y sujetos sanos.
4. Definir el perfil de expresión de miRNAs en diferentes regiones cerebrales de pacientes con EP y donantes sanos, para identificar miRNAs candidatos que podrían estar sobre o infrarrepresentados en el tejido patológico.
5. Analizar los niveles de miRNAs en el plasma sanguíneo de pacientes con EP y sujetos sanos y determinar si alguno de ellos podría ser útil como marcador de la enfermedad.

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcv **Materiales y métodos** ghijkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm
qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes y controles

Los pacientes con EP fueron diagnosticados por los servicios de Neurología de los principales hospitales de Asturias (Hospital Universitario Central de Asturias-HUCA, Hospital de Cabueñes, Hospital San Agustín y Hospital Álvarez-Buylla) y de la Clínica Universitaria de Pamplona. El diagnóstico de EP se estableció siguiendo los criterios de diagnóstico internacionales del banco de tejido cerebral de Reino Unido (UKPDSBB), descritos por Hughes y cols. ^[92]. El estudio fue aprobado por el Comité Regional de Investigación Ética y todos los participantes dieron su consentimiento firmado.

Dependiendo de la edad de comienzo de la enfermedad, los pacientes se categorizaron como de inicio temprano (edad de inicio \leq 50 años) o inicio tardío ($>$ 50 años). Los controles eran donantes sin síntomas de EP u otra neurodegenerativa, pertenecientes a la población general o pareja de los pacientes.

En total se incluyeron 1169 individuos con una edad media de inicio y desviación estándar (DE) de 59 ± 12 años, 56 % varones. Los controles eran en total 772 individuos con edad media y DE de 64 ± 17 años y un 42 % de varones.

Partiendo de 10 ml de sangre en tubos con EDTA, se procedió a la extracción del ADN leucocitario mediante el método de precipitación salina basado en el descrito por Miller y cols. ^[93]. El ADN se resuspendió en agua destilada, se ajustó a una concentración final de 500 ng/ μ L, y se congeló a -20°C .

2. Tejidos cerebrales

Los tejidos de *Sustantia Nigra* (SN), cerebelo (CB) y córtex occipital (CO) de un total de 10 pacientes con EP y 6 donantes sanos se obtuvieron a través del *London Neurodegenerative Diseases Brain Bank* (LNDBB) y el Biobanco de HUCA. Todas las

muestras venían acompañadas de un diagnóstico *postmortem* y datos clínicos. La extracción de ADN de tejido cerebral se realizó a partir de unos 20 mg de tejido con el kit GeneJet para purificación de ADN genómico (#k0721 Fermentas, EEUU). La extracción del ARN se detallará en un apartado posterior.

3. Plasma sanguíneo y leucocitos

Se obtuvo sangre en tubos con EDTA de 31 pacientes (edad media 64 años, 55% varones) y 25 controles sanos (edad media 67 ± 15 ; 52 % varones). Los pacientes habían sido diagnosticados de EP y no estaban aún sometidos a tratamiento farmacológico. De esta manera, se podría determinar la expresión basal de miRNAs circulantes, que podría verse influida por el tratamiento. Además, se obtuvo sangre de 25 pacientes con enfermedad de Alzheimer (edad media 79 ± 4 ; 55 % varones). Los tubos con la sangre se centrifugaron 10 min a 3.500 rpm y con el plasma se hicieron alícuotas de 350 μ l en tubos Eppendorf que se congelaron a -80°C . La fase celular fue lisada para eliminar los eritrocitos, y el botón celular final (leucocitos) se congeló a -80°C . Las muestras fueron procesadas para obtener el ARN según se describe más adelante.

4. Análisis de la variación genética

Para el estudio de las regiones 3'UTR se procedió a amplificar fragmentos solapantes de unas 300 pb (4 para *SNCA* y 6 para *LRRK2*) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**Tabla 3**). En el caso de *SNCA*, se amplificaron también los exones codificantes mediante cebadores específicos de los intrones, y los exones 31 y 41 en el caso de *LRRK2* (**Tabla 4**). En cuanto a los miRNAs, se amplificaron fragmentos de las secuencias de los pri-miRNAs que contenían el miRNA maduro y el pre-miRNA. Las parejas de cebadores se diseñaron con ayuda del programa OligoCalc o Primer3.

Para la amplificación del ADN se partió de 1 μ l de ADN a 50 ng/ μ l, se procedió a la amplificación mediante adición de 1 μ l de los cebadores directo y reverso (10 μ M), 0.2 mM

de cada dNTP (desoxinucleótidos), 1x de standard buffer de Biotools (composición: Tris HCL 75mM a pH 9.0, MgCl₂ 2mM, KCL 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20Mm), 1 µl de Taq ADN polimerasa (Biotools) y H₂O estéril hasta un volumen final de 20 µl. En algunos casos, para mejorar la especificidad fue necesario añadir 0,5 µl de DMSO (dimetil sulfóxido) o formamida. Tras 5 min de desnaturalización inicial a 95°C tienen lugar 32 ciclos de amplificación constituidos cada uno por una etapa de desnaturalización a 95°C durante 30s, una etapa de anillamiento de los cebadores a la temperatura específica de cada pareja (entre 53 y 65°C) durante 40 s y una extensión a 72°C durante 30-50 s según el tamaño del fragmento a amplificar. Una vez finalizados los 32 ciclos se produce una extensión final de 5 min a 72°C. El producto resultante se visualiza en un transiluminador UV tras electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Tabla 3. Cebadores diseñados para la amplificación de los exones de los genes *SNCA* y *LRRK2*.

Fragmento	Secuencia 5'-3' (cebadores directo y reverso)	Tamaño (pb)	Tª anillamiento
LRRK2_ex31	TGA AAG CAA ACA CAA GAG GGT ATT TCT CTA CCA GCC TAC CAT G	285	56 °C
LRRK2_ex41	GAT GCT TGA CAT AGT GGA CAT T TTC TAC AGC AGT ACT GAG CAA GG	229	53°C
SNCA_ex2	TCA GTG TTT TTT GTT TAT TTT TCC C TCA AGA GAG AGA ACT ACCC AGC AT	301	58°C
SNCA_ex3	GGT TAG GAG TTC CTT CTT CTA GT TTT CAT AGG AAT CTT GAT ACT GGG C	306	58°C
SNCA_ex4	CGA TGG CTA GTG GAA GTG GA TTC ACA TGA AAA TGA ACC GTA	292	58°C
SNCA_ex5	GGT TCT GAT TTT TAA AAA GTG AA CTC ACT AAG CAC TAA TGA AAG AG	240	55°C

Tabla 4. Cebadores diseñados para la amplificación de los fragmentos de la región 3'UTR de los genes *SNCA* (*ENST00000394986*) y *LRRK2* (*ENST00000298910*).

Fragmento	Secuencia 5'-3' (cebadores directo y reverso)	Tamaño (pb)	T ^a anillamiento
SNCA_3'UTR_F1	GCT GTC AGT GCT GAT GCG CCA CAA AAT CCA CAG CAC AC	344	58°C
SNCA_3'UTR_F2	AAG TAT CTG TAC CTG CCC C CTC CAT TTA TAT ACA AAC ACA AGT	334	61°C
SNCA_3'UTR_F3	GTG AGT ATG AAA CTA TGC ACC CCA CTC TAC AAT AGT AGT TGG GG	410	60°C
SNCA_3'UTR_F4	ACT GCC AGA AGT GTG TTT TG TGT CTT ATG GCT CTC TAA GGA G	273	61°C
LRRK2_3'UTR_F1	CAA TCT TCC ACA TGA AGT GC CTT TAA AAT ACA CAT TTA CTG GTA AG	277	58°C
LRRK2_3'UTR_F2	GTC CGT GTG TAT GAA GGA A CAT TAC ATG GGA AAC TGT CTT AA	338	58°C
LRRK2_3'UTR_F3	GAT TTT TCT AGA AAT CTG CAC G CTC TAT TAT GTC TAG GAA AGA CAC AG	334	59°C
LRRK2_3'UTR_F4	CAT ACT GTC AAA GTC CTC ATA TCT AG GGT TTC TAT CTG AAT GAT GTA GGA	295	58°C
LRRK2_3'UTR_F5	GCT GCA GAT CCT ACA TCA TTC CCT ATC ACA GGG AAT TAT CTG AA	329	58°C
LRRK2_3'UTR_F6	GGT AAA TTC TTT GGC CCT G CAT AAA CAT GCT TAA AAG CAT TTA	375	59°C

4.1. Análisis de la conformación de la hebra sencilla (SSCA)

Esta técnica (SSCA) se empleó para buscar variantes en las regiones 3'UTR de los genes *SNCA* y *LRRK2*. La técnica se basa en que cambios en la composición de los ácidos nucleicos afectan a la conformación de la hebra sencilla de ADN y por lo tanto a la movilidad de los fragmentos cuando se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes. El amplificado de PCR se mezcló con un tampón de carga para SSCA (EDTA, formamida desionizada y Xylene cyanol) en un ratio 1:4, se desnaturizó a 95°C durante 5 min y 2 min de “choque frío” en hielo. La electroforesis se

realizó en geles de poliacrilamida (**Tabla 5**). Los geles se tiñeron con nitrato de plata según el protocolo de Merrill y cols. ^[94].

Tabla 5. Condiciones de concentración acrilamida:bisacrilamida y de electroforesis para los geles de SSCA, según los fragmentos analizados.

Fragmento	Tipo de gel (acrilamida/bisacrilamida)	Condiciones
SNCA_3'UTR_F1	29:1-14%	20W 8h
SNCA_3'UTR_F2	29:1-12%	12W 21h
SNCA_3'UTR_F3	49:1-12%	15W 9h
LRRK2_3'UTR_F1	49:1-10%+10%glicerol	8W 26h
LRRK2_3'UTR_F2	49:1-10%+2,5%glicerol	13W 24h
LRRK2_3'UTR_F3	29:1-12%	12W 20h
LRRK2_3'UTR_F4	49:1-12%	10W 20h
LRRK2_3'UTR_F5	29:1-12%	8W 22h
LRRK2_3'UTR_F6	29:1-12%	12W 20h

4.2 Genotipado mediante enzimas de restricción.

Esta técnica (PCR-RFLP) se empleó para caracterizar las variantes p.G2019S y p.R1441G/C en *LRRK2* y rs356165 en *SNCA*. La mutación G2019S se determinó mediante digestión del amplificado del exón 41 con el enzima de restricción *HaeIII*. La mutación R1441G/C se estudió mediante digestión con el enzima de restricción *BstUI* del fragmento del exón 31 de *LRRK2*. En ambos casos el producto de la digestión se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Para el estudio de la variante rs356165T>C en la 3'UTR del gen *SNCA* el producto de PCR fue digerido con el enzima *TaqI*, y el producto de la digestión se corrió en geles de agarosa al 4%.

4.3 Genotipado mediante sondas TaqMan

Las sondas Taqman o sondas de hidrólisis consisten en oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador (**Figura 9**). Se asocia un fluoróforo diferente, VIC (Abs.554nm) y FAM (Abs.530nm) a cada uno de los alelos del polimorfismo.

Los siguientes polimorfismos se genotiparon mediante PCR en tiempo real con sondas Taqman (TaqMan® SNP Genotyping Assays; Applied Biosystems): rs11931074 (G>T) en la 3' UTR de *SNCA* (ensayo C_3208972_10), rs2619364 en el promotor de *SNCA* (C_3113461_10), y rs6848726 en el intrón 4 de *SNCA* (C_28994911_10). El volumen de reacción por pocillo fue de 10 µl: 5 µl TaqMan Genotyping Master Mix, 3,75 µl H₂O, 0,25 µl sonda y 1 µl ADN. Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) a las condiciones estándar y se analizaron con el software 7500 v.2.0.1.

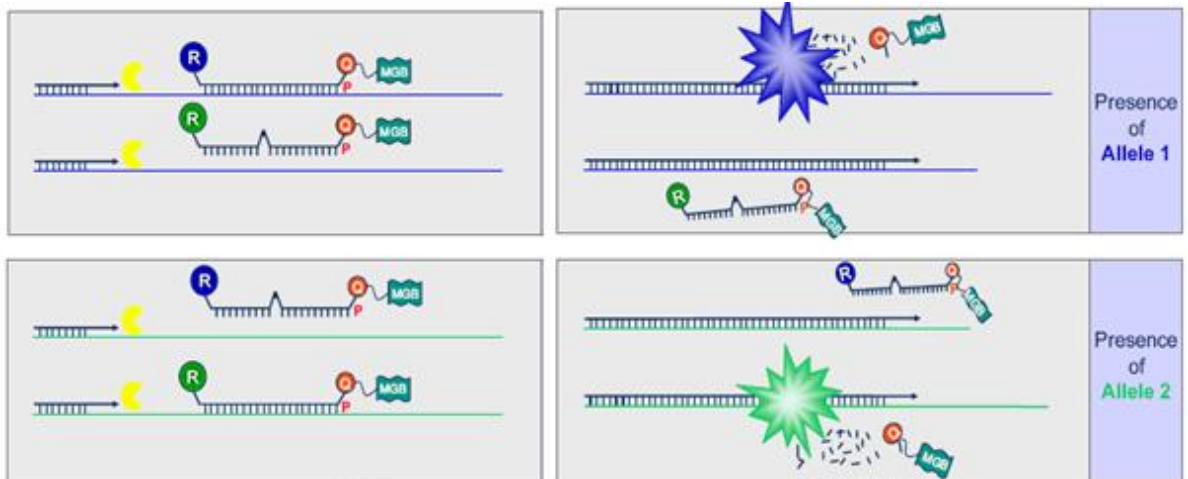


Figura 9. Mecanismo de actuación de las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan.

4.4. Secuenciación directa por el método de *Sanger*

Los casos con patrones de SSCA anómalos fueron secuenciados mediante química de Big-Dye en un equipo ABI3130 (Applied Biosystems; California, EEUU). Así mismo, también se secuenciaron los fragmentos de los exones 2 a 5 del gen *SNCA* de los tejidos cerebrales, para determinar la presencia de mutaciones. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit DNA gel Extraction Kit (Millipore™; Billerica, MA, EEUU) o el Speedtools PCR clean-up Kit (Biotools B&M Labs, S.A., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto purificado se sometió a PCR de secuenciación partiendo de 3 µl de producto de PCR, 3 pmol del cebador correspondiente y 5 µl de Terminator Ready Reaction Mix. Posteriormente, se procedió a precipitación del producto mediante la adición de 37 µl de solución SAM™ y 9 µl de la solución BigDye®XTerminator (Applied Biosystems; California, EEUU) y el producto final se sometió a electroforesis capilar.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y alineadas con las de referencia en la base de datos Ensembl (www.ensembl.org) mediante el programa informático SeqScape® versión 2.6.

5. Análisis de la unión de miRNAs a la 3'UTR de *LRRK2*

La predicción de sitios de unión de microRNAs en las secuencias 3'UTR de *LRRK2* se realizó mediante las plataformas informáticas TargetScanHuman v.5.1 (www.targetscan.org) y microRNA.org (www.microrna.org).

Los miRNAs con valor SVR menor o igual a -0,1 fueron considerados candidatos a unirse a la secuencia 3' UTR. Este valor depende entre otros de la predicción de los duplexos miRNA-secuencia 3'UTR, del apareamiento de bases en la región semilla, de la composición en AU que flanquea el lugar de unión, de la accesibilidad a la estructura secundaria, de la longitud de la 3'UTR, de la posición relativa de la diana o del nivel de conservación entre especies de la región 3'UTR ^[95]. Se seleccionó miR-138.2* como candidato a unirse a la 3'UTR del gen *LRRK2* (SVRscore= -0.339, PhastCons score= 0.502), y miR-205 como control de transfección (SVRscore= -1.107, PhastCons score= 0.502). ^[96].

Para el ensayo funcional, se ligaron los pre-miR-205 y pre-miR-138.2* en dos plásmidos reporteros. Estos pre-miRNAs se habían amplificado a partir de ADN genómico con los siguientes cebadores:

MiR-205: 5'-TCAGGATCCTTGACATCTCCC / 5'-ATTGGTCGACATTTCTCTCTGGCT

MiR-138.2: 5'-CATACTGGATCCTGGGGGAGC / 5'-CTACAGAGTCGACAAGCTTTCACAC

Los fragmentos se digirieron con los enzimas de restricción BamHI y Sall para poder insertarlos en el vector pTarget (pTarget Mammalian expression vector system; Promega Corp., Madison, WI, EEUU) mediante una T4 DNA ligasa. Posteriormente se realizó la transformación en bacterias *E. coli* competentes mediante choque térmico, seguido de sembrado y crecimiento en placas de LB+agar con ampicilina. Las colonias se secuenciaron para comprobar la secuencia del pre-miRNA y las que poseían un inserto correcto se recrecieron y se procedió a purificar el vector (kit Qiagen® Midi Kit; Qiagen, Valencia, CA, EEUU).

Para el ensayo funcional se utilizaron células HEK-293 (Human Embryonic Kidney) en placas Petri de 10 cm con medio de cultivo DMEM-F12 + 10% de suero fetal bovino y 100 U/ml de penicilina + 100 µg/ml de estreptomicina, a 37°C en un atmósfera con un 5% de CO₂. Las células se añadieron a las placas 24 h antes de la transfección, a una concentración de 5x10⁴ células por pocillo. Para ensayar la eficiencia de la transfección, se añadió el plásmido con el pre-miR-205 a concentraciones crecientes desde 25 ng a 300 ng, se cultivaron las células, se extrajo el ARN y se realizó la transcripción reversa, y se cuantificó el nivel del miRNA mediante PCR en tiempo real con una sonda Taqman. Las células se habían transfectado también con un vector reportero de GFP (proteína verde fluorescente) a concentraciones crecientes de 100, 150 y 300 ng, lo que permite visualizar la eficiencia del proceso mediante un microscopio invertido (Olympus IX71).

Para ensayar la secuencia 3'UTR del *LRRK2*, las células se transfectaron con 100 ng por pocillo del vector reportero 3'UTR-luciferasa, 40 ng del vector Renilla, y 3 cantidades del vector con el pre-miR-138.2 (100 ng, 150 ng y 300 ng). Cada condición se ensayó por triplicado y cada experimento se repitió 3 veces. La reacción se llevó a cabo con el reactivo Fugene[®]6 Transfection Reagent (Promega Corp., Madison, WI, EEUU) en una ratio 3,5:1. A las 48h se ensayó la expresión de luciferasa usando el kit Dual-Luciferase[®] reporter assay system (Promega Corp., Madison, WI, EEUU). Para ello, se aspiró el medio de cultivo de los pocillos, se lavaron las células con PBS (tampón fosfato salino), y se añadieron 100 µl de solución de lisis con agitación durante 15 min. La determinación de la señal se realizó en un luminómetro (FB12 Single tube luminometer) con el software Sirius PC, mezclando 10 µl del lisado celular con 50 µl de reactivo LAR (Luciferase Assay Reagent) en tubos Eppendorff de 1,5 ml. Tras obtener la medida de expresión de luciferasa, se añadieron 50 µl del reactivo Stop&Glo y se midió la actividad Renilla. La actividad basal de luciferasa se normalizó frente a la de Renilla.

6. Extracción del ARN

6.1. ARN de plasma sanguíneo y leucocitos

Las alícuotas de 350 µl de plasma sanguíneo conservadas a -80°C se descongelaron y procesaron con el reactivo TRIzol® LS Reagent (Ambion®, Life Technologies) que optimiza la extracción de ARN de fluidos biológicos^[97]. Tras añadir 3 volúmenes de TRIzol e incubar durante 5 min, se añadieron 4 pg del miRNA sintético Ath-miR-159-a de *A. thaliana* (control de extracción) y seguidamente 250 µl de cloroformo; se incubó la mezcla durante 10 min. A continuación, centrifugamos 15 min a 12.000 x g a 4°C, la fase acuosa (que contiene el ARN) se trasvasó a un tubo limpio y se añadieron 500 µl de isopropanol frío manteniendo la mezcla a -20°C durante 24 h. Se centrifugó durante 10 min a 12.000 x g y a 4°C, se eliminó el sobrenadante y sobre el precipitado se añadió 1ml de etanol frío al 70%. Finalmente, tras mezclar se centrifugó a 7.500 x g durante 5 min, el sobrenadante fue desechado, el precipitado se secó al aire durante 15 min y se resuspendió en 25 µl de agua libre de DNAsa y RNAsa. La calidad y cantidad de los ARNs se determinó con el NanoDrop y solo muestras de alta calidad (ratio 260/280 entre 1.8 y 2) fueron utilizadas.

El botón leucocitario de las muestras de sangre que se había conservado a -80°C (tras tratamiento con RNAlater; Qiagen, Hilden, Alemania) fue procesado de la misma forma, pero con el reactivo TRI Reagent (Sigma-Aldrich; St Louis, EEUU) indicado para tejidos y células.

6.2. ARN de tejido cerebral

El ARN de tejido cerebral se obtuvo mediante el kit NucleoSpin® miRNA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG; Düren, Alemania), que permite la extracción de ARN total o ARN de cadena larga (>200 pb) y pequeña (≤200 pb) en dos pasos diferentes. En todas las muestras se partió de la cantidad de tejido recomendada, 30 mg máximo, y a lo largo del proceso se incubó con DNAsa para evitar la “contaminación” de las muestras con

ADN. La calidad y cantidad de los ARNs se determinó con el NanoDrop. Para el ARN de cadena larga, una alícuota de cada muestra fue sometida a electroforesis seguida de visualización en transiluminador de uv para constatar la integridad y la ausencia de ADN genómico (**Figura 10**). En el caso del ARN de cadena pequeña extraído de tejido cerebral, se analizó la calidad e integridad con el Small RNA chip de Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) (**Figura 11**).

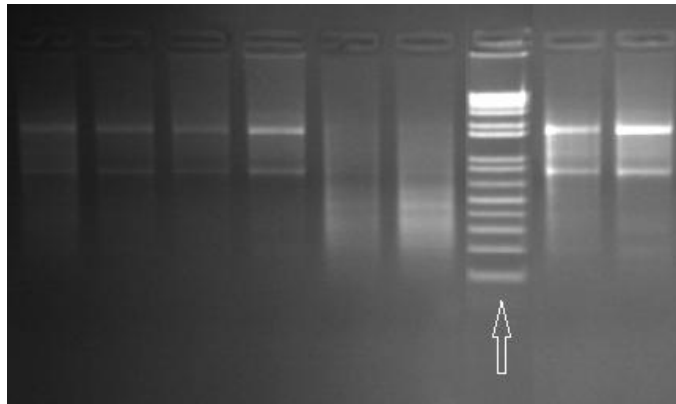


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para valorar la calidad del ARN. La flecha indica la calle con el marcador de tamaño.

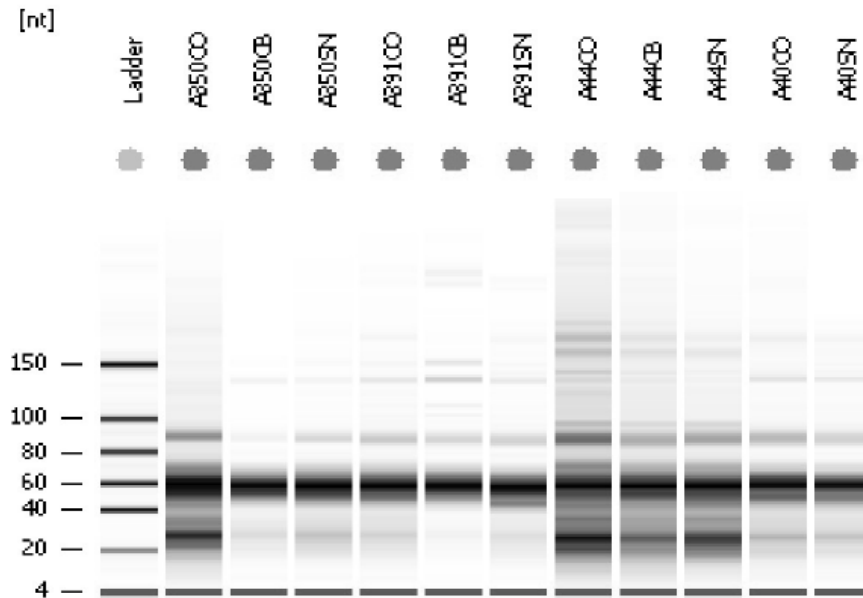


Figura 11. Electroferograma obtenido con el Agilent Bioanalyzer smallRNA chip. Se muestra la calidad de varias muestras de tejido de SN, CB y CO. El chip cuantifica la calidad de ARN menor de 150 pb y la fracción de miRNAs se encuentra entre las bandas de 20 y 40 pb.

7. Cuantificación relativa del ARNm de *SNCA* y *LRRK2*.

A partir de unos 500 ng de ARN largo de tejido cerebral se sintetizó el ADN complementario (ADNc) mediante el kit QuantiTect[®] Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Alemania). Como primer paso se eliminó el ADN genómico mezclando el ARN con 2 μ l de solución gDNA *Wipeout* e incubando a 42°C durante 5 min. Posteriormente se añadieron los componentes de la reacción de transcripción reversa: 4 μ l de Quantiscript RT buffer, 1 μ l de RT primer, y 1 μ l de Quantiscript reverse transcriptase. Se incubó la mezcla a 42°C durante 30 min, seguido de inactivación del enzima a 95°C durante 3 min. El producto final se almacenó a -20°C hasta su uso en los ensayos de expresión.

En el caso del gen *SNCA* hay 4 transcritos de ARNm bien caracterizados, determinamos los niveles de cada transcrito individualmente (**Figura 12**).

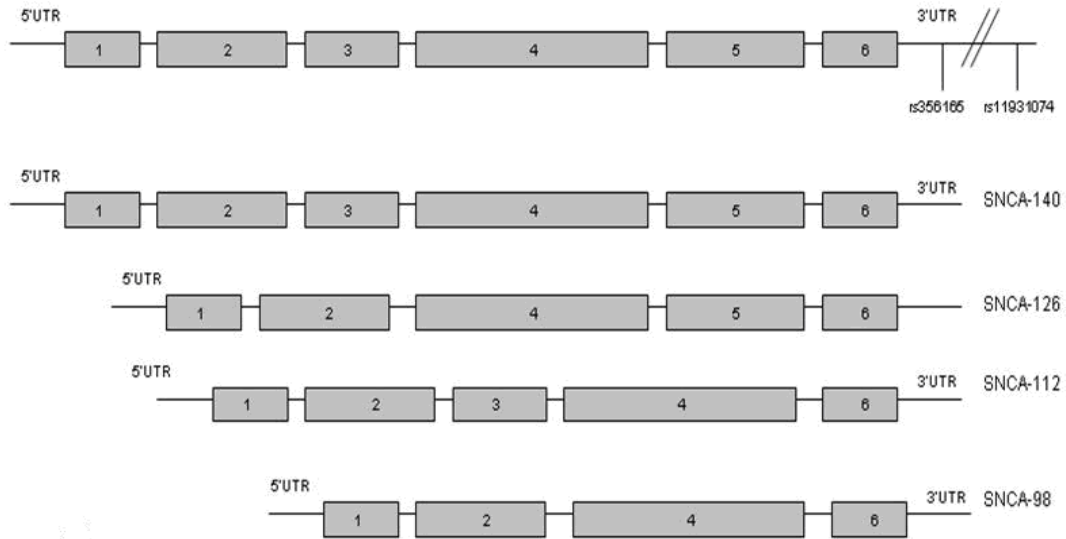


Figura 12. Transcritos de ARNm de *SNCA* (exones 1 a 6; exón 1 no codificante). Se indica también la posición de los polimorfismos rs356165 y rs11931074.

Los cebadores para amplificar los ADNc se diseñaron con anclaje en dos exones contiguos (skipping) para favorecer la no amplificación de ADN genómico en el caso de que pudiera quedar algún remanente (**Tabla 6**). Como gen constitutivo para la normalización se empleó *GAPDH*.

Tabla 6. Cebadores para la amplificación de ADNc de *GAPDH*, *LRRK2*, e isoformas de *SNCA*.

Gen	Cebadores directo y reverso (5' > 3')	Tamaño (pb)	Tª anillamiento
GAPDH	GGA AGG ACT CAT GAC CAC AG TTG GCA GGT TTT TCT AGA CGT	249	58°C
GAPDH	CTC TGC TCC TCC TGT TCG AC TTA AAA GCA GCC CTG GTG AC	143	60°C
SNCA-140	AAA ACC AAG GAG GGA GTG GT GCC TCA TTG TCA GGA TCC AC	245	58°C
SNCA-126	CTC TAT CTA GTG GCT GAG AAG AC GCC TCA TTG TCA GGA TCC AC	218	58°C
SNCA-112	AAA ACC AAG GAG GGA GTG GT ATA CCC TTC CTT GCC CAA CTG	189	60°C
SNCA-98	CTC TAT CTA GTG GCT GAG AAG AC ATA CCC TTC CTT GCC CAA CTG	162	60°C
LRRK2	ATA TAA AGG CTC GCG CTT CT TGG CAT TCA CAA AGT GGT AAT	162	58°C

El nivel de cada transcrito se determinó por duplicado y en tres ensayos independientes mediante PCR en tiempo real por el método de los $\Delta\Delta C_t$, en un equipo ABI 7500. Para ello se empleó el reactivo iTaq™ Universal SYBER® Green Supermix (Bio-Rad laboratorios, Hercules, CA, EEUU) en reacciones conteniendo 10 μ l de este reactivo, 1 μ l de cada cebador (a concentración 10 μ M), 8 μ l de H₂O, y 1 μ l del ADNc. Las temperaturas de anillamiento fueron optimizadas para cada transcrito (**Tabla 6**). Las condiciones de PCR fueron: 95°C 30 s, 35 ciclos de 95°C 15 s + 58°C 34 s (SNCA-140, -126) o 95°C 15 s + 60°C 34 s (SNCA-112, -98) y estadio de curva de melting o de disociación. Para el transcrito del gen *LRRK2* 40 ciclos a 58°C 30 s. Para verificar la especificidad de las amplificaciones, se chequearon 5 μ l del producto final en geles de agarosa al 2%, y se secuenciaron dos fragmentos de cada transcrito.

Los niveles de expresión de *SNCA* y *LRRK2* se normalizaron frente a los niveles del gen constitutivo (*GADPH*) y para cada muestra se calculó el nivel relativo de expresión

frente a un grupo de referencia (en este caso, pacientes vs controles) según la fórmula de Livak y Smittchgen ^[98].

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra problema} - \Delta Ct \text{ muestra referencia}$, siendo:

Ct: ciclo en el que la cantidad de expresión detectada supera el umbral

ΔCt : Ct gen problema - Ct gen endógeno

La expresión relativa se representó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$, valor conocido como FC (*fold change*) o RQ (*relative quantification*).

8. Perfil de expresión de microRNAs

El perfil de expresión de miRNAs se determinó sobre el ARN pequeño de plasmas sanguíneos y de tejidos, siguiendo tres procesos: transcripción reversa del ARN, preamplificación de los ADNc y cuantificación mediante PCR en tiempo real en placas TLDA (*TaqMan Low Density Arrays*).

8.1. MiRNAs en el plasma

Una vez descongeladas, las muestras de ARN se procesaron con el kit MegaplexTM RT Primers Human pool A v2.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA). La reacción contenía 500 ng de ARN pequeño, 0,80 μl de Megaplex RT primers, 0,20 μl de dNTPs, 1,5 μl de MultiScribe Reverse Transcriptase, 0,80 μl de RT buffer, 0,90 μl de MgCl_2 , 0,20 μl de H_2O libre de nucleasas, y 0,10 μl de RNase inhibitor. La mezcla se incubó 5 min en hielo y se sometió a 40 ciclos de 16°C- 2 min, 42°C- 1 min, y 50°C- 1 s, para finalizar con un ciclo de 5 min a 85°C y enfriamiento a 4°C.

El ADNc de cada muestra fue preamplificado con el kit MegaplexTM PreAmp Primers Human pool A v2.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA). Se mezclaron 3 μl del producto de retrotranscripción con 1,25 μl de Megaplex PreAmp primers, 6,25 μl de TaqMan PreAmp Master Mix, y 3,75 μl de H_2O libre de nucleasas. La reacción consistía en una

desnaturalización inicial a 95°C-10 min, seguida de 2 min a 55°C y 2 min a 72°C, y 12 ciclos de 95°C - 15 s + 60°C- 4min, para finalizar con una etapa de 10 min a 99,9°C 1 y enfriamiento a 4°C.

Previo al análisis TLDA, se validaron las muestras en un ensayo TaqMan individual con el miRNA Ath-159a como diana; muestras con Ct fuera del rango 20-26 no se consideraron válidas y no fueron incluidas en el estudio.

Para cuantificar la expresión de miRNAs se crearon 3 mezclas (pooles) a partir de las preamplificaciones 4 enfermos y 3 mezclas con 4 controles cada una. Las seis muestras se cargaron en placas TLDA (TaqMan Low Density Arrays) Human pool A y se procesaron mediante PCR en tiempo real en un equipo ABI7900 HT Fast Real Time. Mediante este proceso se puede determinar el grado de amplificación de 384 fragmentos diana, incluyendo miRNAs y controles endógenos (otros ARNs pequeños). Los perfiles de amplificación de cada diana se analizaron mediante el software RQ manager 1.2, con el miR-191 como control endógeno y el valor de cada miRNA en los tres pooles de controles como referencia. Aquéllos miRNAs con diferencias significativas entre pacientes y controles se consideraron candidatos para validación posterior mediante ensayos individuales en los pacientes y controles. En este caso, los preamplificados de cada muestra se analizaron por triplicado mediante PCR en tiempo real con sondas TaqMan específicas de cada miRNA, y los niveles de expresión en cada paciente se presentaron según la fórmula $\Delta\Delta Ct$. La muestra de referencia fue constante en todos los ensayos y estaba compuesta por una mezcla de preamplificado de varios individuos control:

ΔCt : Ct miRNA problema-Ct miR-191

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ muestra problema- ΔCt pool control

$RQ (FC) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

8.2 MiRNAs en tejido cerebral

El perfil de expresión de los miRNAs en tejido cerebral se realizó sobre ARN pequeño de la SN de pacientes y controles. Cada muestra se sometió a dos retrotranscripciones con Megaplex™ RT Primers Human v2.1, una con el pool A y otra con el B. Se siguió el procedimiento descrito para las muestras de plasma. Cada retrotranscripción fue preamplificada con el Megaplex™ PreAmp Primers Human pool A o pool B. Finalmente, cada preamplificado se cargó en una placa TLDA-A o TLDA-B, y los valores de cada miRNA se volcaron en una hoja Excel y analizaron con el software Expression Suite v1.0.3. En el caso de los tejidos, los controles de normalización endógenos utilizados fueron los ARN pequeños RNU-44 y U6sn. Los miRNAs candidatos, cuya expresión difería entre pacientes y controles, fueron cuantificados mediante ensayos TaqMan individuales en las tres regiones cerebrales (SN, CB y CO):

ΔCt : Ct miRNA problema-Ct RNU44

$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct muestra problema} - \Delta\text{Ct pool control}$

$\text{RQ (FC)} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

9. Análisis estadístico

Los datos clínicos y demográficos de los pacientes y controles, así como los genotipos de todas las variantes estudiadas, se integraron en una base de datos en SPSS v17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU). Para comprobar si las variantes genéticas estudiadas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó un calculador *online* (<http://www.oege.org/software/hardy-weinberg.html>).

Las frecuencias alélicas y genotípicas se compararon mediante el test Chi-cuadrado. Las comparaciones de medias se realizaron mediante test T-Student o ANOVA asumiendo igualdad de las varianzas, o mediante la U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis en el caso de no igualdad de varianzas.

Para ver la correlación entre las diferentes variables, se realizaron análisis multivariantes (regresión logística binaria, regresión lineal).

El estudio de haplotipos del gen *SNCA* se realizó mediante el programa Haploview 4.2 utilizando la regla de los cuatro gametos descrita por Wang y cols. para definir los bloques haplotípicos ^[99].

En el caso de las variantes nucleotídicas con frecuencia <1% o con correlación con la enfermedad, se analizó su posible efecto sobre la estabilidad del ARNm en relación a la secuencia 3'UTR, mediante el uso del programa SNPfold (<http://ribosnitch.bio.unc.edu/SNPfold/SNPfold.html>)

Para todos los análisis, un valor $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo.

qwertyuiopasdfghijklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghijklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghijklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghijklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyui **Resultados** lzxcv
bnmqwertyuiopasdfghijklzxcvbnm
qwertyuiopasdfghijklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghijklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghijklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghijklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghijklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghijklzxcvbnm

RESULTADOS

1. Características de los pacientes y controles

Las características demográficas de las cohortes de Asturias y Navarra se presentan en la **Tabla 7**. Los pacientes (n=1.169) tenían una edad media de diagnóstico de 59 ± 12 años y una edad actual de 67 ± 11 años, con un 56% de varones. El 23% tenían una edad de inicio ≤ 50 años (EP temprana) y el 28% tenían al menos un familiar en primer grado también afectado. Los controles (n=772) tenían una edad media actual de 64 ± 17 años y el 42% eran varones. No había diferencias significativas en la edad media de inicio de los pacientes entre las cohortes de Asturias y Navarra y las edades medias de los controles eran también similares.

Tabla 7. Características de los cohortes de pacientes y controles de Asturias y Navarra y de la muestra total.

	ASTURIAS		NAVARRA		TOTAL	
	EP (N=752)	controles (N=480)	EP (N=417)	controles (N=292)	EP (N=1.169)	controles (N=772)
Edad media	59 ± 13	62 ± 18	58 ± 11	63 ± 14	59 ± 12	64 ± 17
Rango de edad	22-91	18-97	18-84	18-100	18-91	18-100
% hombres	356 (47%)	263 (55%)	261 (62%)	102 (35%)	648 (56%)	323 (42%)
Inicio temprano (≤ 50 años)	159 (21%)	—	108 (26%)	—	267 (23%)	—
Historia familiar EP	218 (28%)	—	114 (26%)	—	332 (28%)	—
<i>LRRK2</i>						
p.R1441G	10 (1,3%)	—	1 (0,2%)	—	11 (1%)	—
p.G2019S	15 (2%)	—	6 (1,4%)	—	21 (1,8%)	—

2. Mutaciones *LRRK2* p.R1441G/C y p.G2019S

Todos los pacientes fueron genotipados para las mutaciones p.R1441G/C y p.G2019S en *LRRK2* (Figura X). Alrededor del 3% de los pacientes eran portadores (todos heterocigotos) de las variantes patogénicas p.R1441G o p.G2019S. En la cohorte asturiana 10 pacientes eran portadores p.R1441G y 15 eran portadores p.G2019S. En la cohorte de Navarra, 9 de los pacientes eran portadores de variantes patogénicas en *LRRK2*; 6 de la variante p.G2019S, y 1 de p.R1441G (**Tabla 7**). Además en la cohorte de Navarra, se informó de la presencia de la nueva variante, p.S1761R, en 2 de los pacientes ^[100].

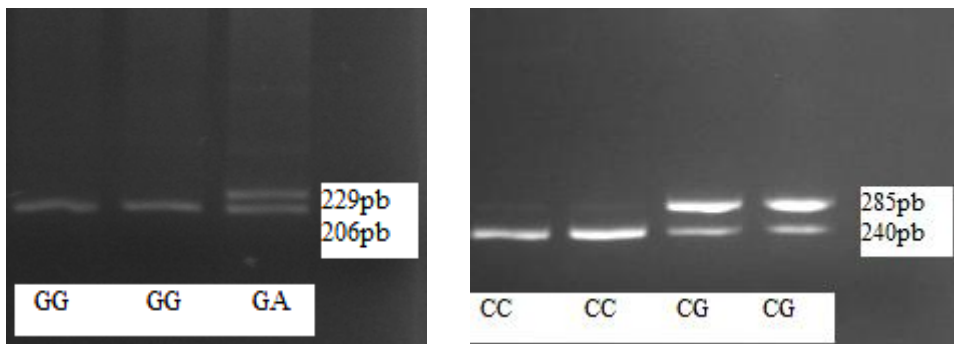


Figura 13. Patrones electroforéticos de la mutación p.G2019S (digestión con HaeIII) y p.R1441G (digestión con BstUI).

3. Variación en la región 3' UTR del gen *SNCA*

La región 3'UTR del gen *SNCA* se estudió en la cohorte de Asturias, amplificando 4 fragmentos solapantes que fueron sometidos a SSCA y secuenciación (**Figura 14**). Identificamos 6 variantes nucleotídicas, 4 ya descritas en las bases de datos y 2 nuevas: c.*502G >A y c.*575_579del (delección ATTTT) (**Tabla 8**).

Únicamente el polimorfismo rs356165 (patrones RFLP en **Figura 15**) mostraba diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pacientes y controles: la

frecuencia del alelo G era mayor en el grupo de pacientes comparado con el de controles (0,37 vs 0,29; $p < 0,0001$), con una $OR = 1,42$, ($95\%CI = 1,19-1,69$) (**Tabla 9**).

Tabla 8. Variantes descritas en la región 3'UTR del gen *SNCA* y número de portadores del alelo "raro" en los pacientes y controles de Asturias. Para el polimorfismo rs356165 se indican las frecuencias del alelo G. Nomenclatura de los alelos según la hebra directa.

Variante	SNP ID	Posición	Frecuencia
G>A	rs76642636	4:90647794	3 EP/4 CNT
A>C	rs10024743	4:90647640	2 EP/0 CNT
G>A	rs17016074	4:90647278	10 EP/4 CNT
C >T	c.*502C>T	4:90647277	0 EP/1 CNT
Del TAAA	c.*575_579del	4:90647204	5 EP/8 CNT
G>A	rs356165	4:90646886	G=0,38/G=0,31

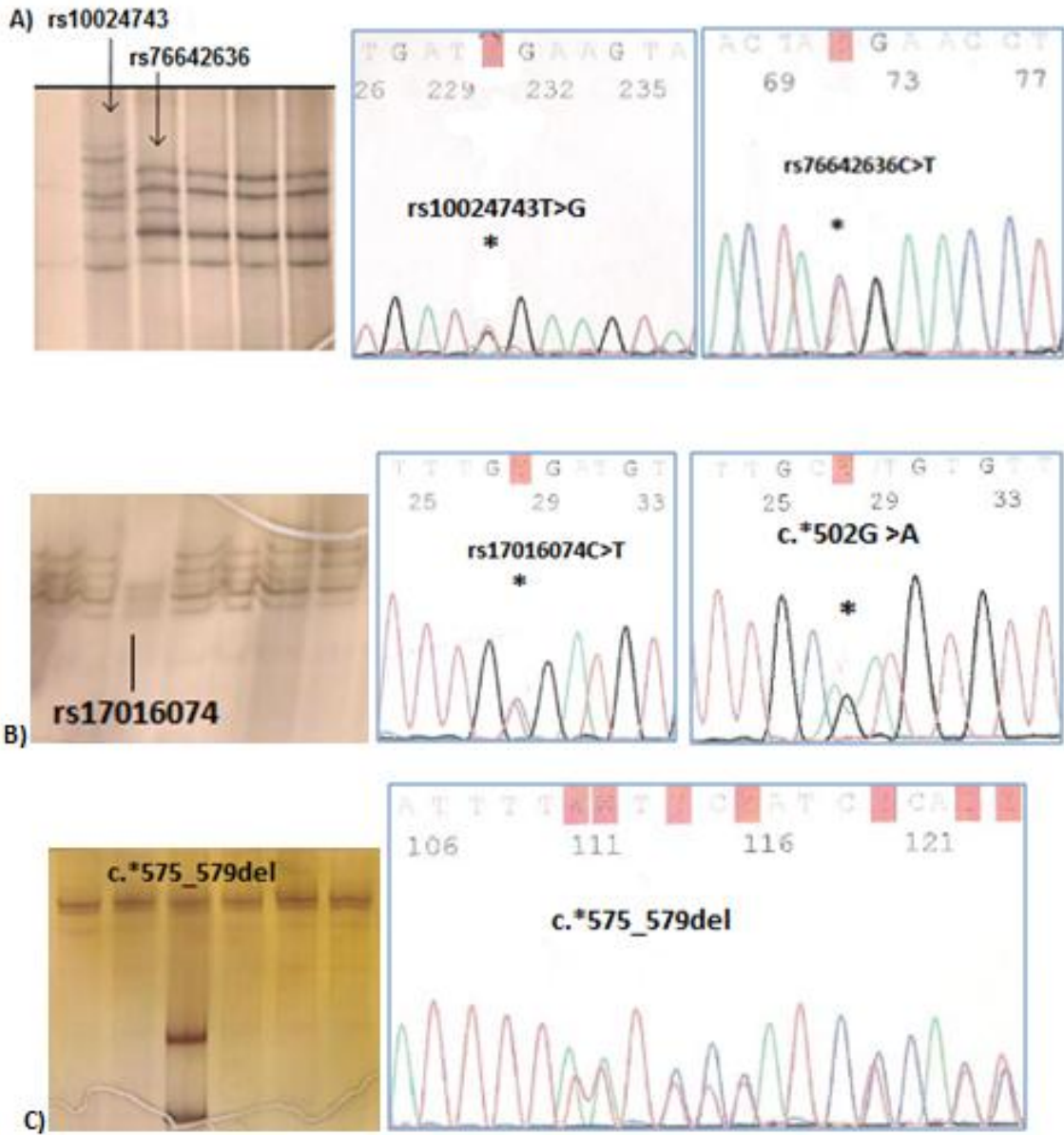


Figura 14. A) Patrones electroforéticos SSCA y secuencias correspondientes de las variantes rs10024743 y rs76642636. B) Patrón electroforético de rs17016074 y secuencia rs17016074 y c.*502G>A. C) Patrón electroforético y secuencia de c.*575_579del.

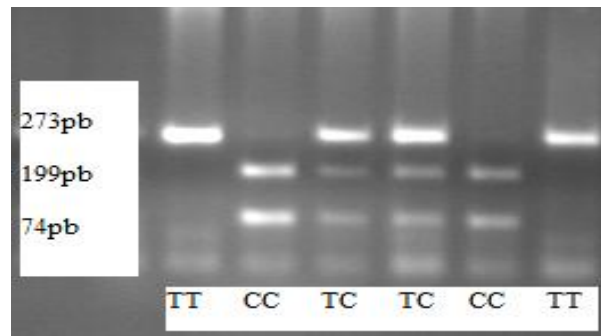


Figura 15. PCR-RFLP del polimorfismo rs356165 del gen *SNCA*.

En la cohorte de Navarra se replicó esta asociación, con $p=0,016$ y $OR=1,31$ ($95\%CI=1,05-1,64$). Para el conjunto de pacientes y controles totales, obtuvimos un valor $p<0,0001$, con una $OR=1,37$ ($95\%CI=1,19-1,58$) (**Tabla 9**). El riesgo del alelo rs356165 G permaneció significativo tras corregir (regresión logística binaria) por edad de inicio y sexo: $p<0,0001$; $OR=1,34$; $95\%CI=1,09-1,65$.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs356165 para los pacientes y controles de las dos cohortes y el total de los pacientes y controles. Se indican también las frecuencias en el estudio 1000 genomas.

	ASTURIAS EP (N=727)	CNT (N=480)	NAVARRA EP (n=408)	CNT (n=292)	TOTAL EP (n=1.135)	CNT (n=772)	1000 G
rs356165							
AA	292 (40%)	247 (52%)	158 (39%)	130 (45%)	450 (40%)	377 (49%)	39%
AG	338 (47%)	188 (39%)	176 (43%)	129 (44%)	514 (45%)	317 (41%)	46%
GG	97 (13%)	45 (9%)	74 (18%)	33 (11%)	171 (15%)	78 (10%)	15%
A	922 (0,63)	682 (0,71)	492 (0,60)	389 (0,67)	1.414 (0,62)	1.071 (0,69)	0,62
G	532 (0,37)	278 (0,29)	324 (0,40)	195 (0,33)	856 (0,38)	473 (0,31)	0,38

RESULTADOS

Los portadores del alelo de riesgo G (GG y AG) tenían una edad de inicio menor que los homocigotos AA ($57,6 \pm 12,5$ vs $60,1 \pm 12,8$; $p=0,003$), lo que sugiere un efecto modificador de la edad de inicio mediado por este polimorfismo de *SNCA*. Este efecto se tradujo en una mayor frecuencia del alelo G entre los pacientes con inicio temprano. Estudiamos si en los portadores de mutación en el gen *LRRK2* ocurría lo mismo, pero a pesar de observarse una tendencia a menor edad de inicio en los portadores del alelo de riesgo, no se alcanzaron diferencias estadísticas significativas ($53,4 \pm 1,2$ vs $58,8 \pm 11,7$; $p>0,05$) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Distribución de las edades medias de inicio de enfermedad en los grupos de EI temprana y tardía, y en portadores *LRRK2*, según el genotipo de rs356165.

	TOTAL EI temprana (N=254)	TOTAL EI tardía (N=881)		LRRK2+ EI temprana (N=13)	LRRK2+ EI tardía (N=21)	
rs356165			media EI			media EI
AA	85 (33%)	365 (41%)	$60,1 \pm 12,8$	5 (38%)	10 (78%)	$58,8 \pm 11,7$
AG	122 (48%)	392 (45%)	$58 \pm 12,4$	7 (54%)	8 (38%)	$51,7 \pm 13,4$
GG	47 (19%)	124 (14%)	$56,6 \pm 12,8$	1 (8%)	3 (14%)	$58,7 \pm 12,9$
A	292 (0,57)	1122 (0,64)		17 (0,65)	28 (0,66)	
G	216 (0,43)	640 (0,36)		8 (0,35)	14 (0,33)	

Finalmente, analizamos el posible impacto del cambio nucleotídico A>G del polimorfismo rs356165 y de las variantes raras encontradas (frecuencia <1%, programa SNPfold). Salvo para rs10024743 T>G, el coeficiente de correlación de las variantes halladas fue mayor de 0,9 ($P>0,05$) por lo que la accesibilidad de la hebra de ARN no se vería modificada por el cambio de nucleótido. En el caso de rs10024743 el coeficiente de correlación fue de 0,66 con $p=0,0006$, lo que sugiere que este cambio T>G podría afectar a la estabilidad del ARN.

4. Efecto de rs356165 sobre la región 3'UTR y la unión de miRNAs

Comprobamos la posible influencia del polimorfismo rs356165 en la unión de miRNAs a la 3'UTR del gen *SNCA*, sin identificar ningún candidato. Las predicciones se realizaron con los software online TargetScan (v 5.2) y miRNA.org, pero ninguno de los miRNAs presentaban una puntuación miRSVR aceptable ($<-0,1$) (**Figura 16**).

```

                                miR-548p
                    miR-3179      miR-323-3p
                miR-1321  miR-514b-3p
            miR-539          miR-514
miR-3121      miR-3159  miR-543 miR-9*
:UCUAUUUCUCCCUCAAUCCUGUCA AUGUUUGCUUUA CGUAUUUU

```

Figura 16. Análisis informático (microRNA.org) de la secuencia conteniendo el polimorfismo rs356165 (azul). Todos los miRNAs señalados presentan un valor estadístico por debajo del mínimo aceptable.

Este polimorfismo podría afectar a la longitud de la región 3'UTR del ARNm. En el gen *SNCA* se ha descrito una 3'UTR corta (574 pb) y otra larga (2.520 pb). Realizamos el estudio de esta región sobre ADNc sintetizado a partir del ARNm de leucocitos de 9 pacientes, 3 de cada uno de los genotipos rs356165. En todas las muestras amplificamos el fragmento correspondiente a la 3'UTR larga, confirmando secuencias correctas y sin reducción de la señal alélica en los heterocigotos (**Figura 17**). Esto sugiere que rs356165 no afectaría a la longitud de la 3'UTR de *SNCA*, ni conllevaría una menor expresión significativa de un alelo respecto al otro.

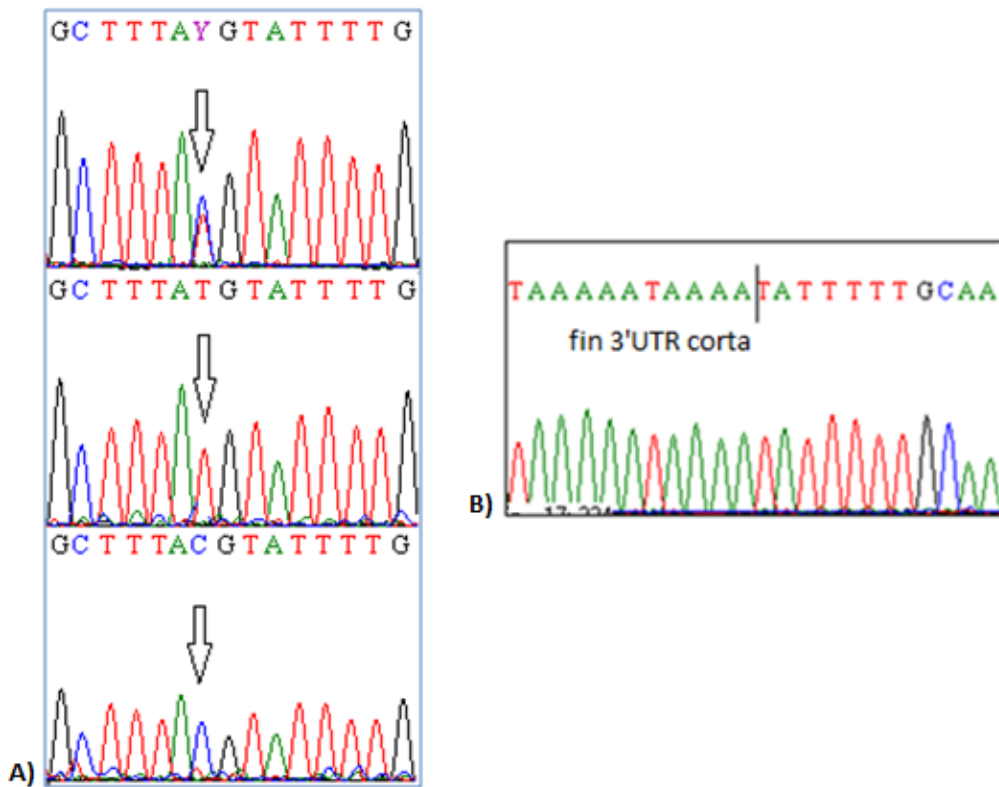


Figura 17. **A)** Fragmento de la región 3'UTR del gen *SNCA* mostrando la secuencia para el polimorfismo rs356165 en los tres genotipos. **B)** Secuencia mostrando la presencia de la secuencia larga. Todas las secuencias se representan en la dirección 3'>5'.

5. Haplotipos de *SNCA*

Ante la ausencia de una evidencia directa que pudiera explicar la asociación entre rs356165 y la EP, nos planteamos estudiar si este SNP estaba en desequilibrio de ligamiento (DL) con alguna otra variante del gen asociada a la enfermedad en estudios previos. Genotipamos los pacientes y controles de Asturias para los polimorfismos rs2619364 en la región promotora, rs6848726 en el intrón 4 y rs11931074 en la región 3' por debajo del gen.

Los polimorfismos rs2619364 y rs6848726 estaban en DL casi total ($D'=0,98$) formando un bloque haplotípico en 5', mientras que rs356165 y rs11931074 formaban otro bloque de DL en la región 3' ($D=0,85$). Para el par rs2619364-rs6848726 no encontramos diferencias en las frecuencias haplotípicas entre pacientes y controles ($p>0,05$). Para el par rs356165-rs11931074 encontramos una mayor frecuencia del haplotipo AG en los controles (62% vs 70%; $p<0,0001$; $OR=0,7$, 95%CI=0,59-0,83) y del haplotipo GT en los pacientes (10% vs 7%; $p=0,017$; $OR=1,44$, 95%CI=1,06-1,96) (**Tabla 11**).

Tabla 11. Frecuencias de los haplotipos compuestos por rs2619364/rs6848726 y rs356165-rs11931074 en pacientes y controles de Asturias.

Haplotipo rs2619364/rs6848726	EP	CNT	X ² p-valor	OR (95%CI)
AC	40%	40%	0,92	1 (0,7-1,4)
AT	35%	37%	0,62	1 (0,7-1,5)
GC	25%	23%	0,53	0,9 (0,6-1,3)
Haplotipo rs356165/rs11931074	EP	CNT	X ² p-valor	OR (95%CI)
AG	62,2%	70,1%	$5,86 \times 10^{-5}$	0,7 (0,59-0,83)
GG	27,2%	22,3%	0,0057	1,3 (1,08-1,58)
GT	9,4%	6,7%	0,017	1,44 (1,06-1,96)
AT	1,2%	0,9%	0,604	1,27 (0,56-2,83)

Analizamos las frecuencias genotípicas y alélicas de rs11931074 en la cohorte asturiana, para ver si de manera independiente este SNP se asociaba a la EP. La comparación de frecuencias bajo un modelo de dominancia mostró diferencias significativas ($p=0,02$; $OR=1,43$; 95%CI=1,04-1,95 (**Tabla 12**). Sin embargo, la comparación entre enfermos con inicio temprano y tardío no mostró diferencias significativas. El alto DL entre rs11931074 y rs356165 y el hecho de que el haplotipo AT (protector rs356165/riesgo rs11931074) tenga frecuencias similares en pacientes y controles sugiere que el efecto de rs11931074 podría ser explicado por “arrastre” por parte del alelo de riesgo rs356165-G.

Tabla 12. Frecuencias del SNP rs11931074 en paciente y controles de Asturias.

rs11931074	PD (N=734)	CNT (N=480)	I temprano (N=162)	I tardío (N=572)	1000 genomas
GG	590 (81%)	410 (85%)	128 (79%)	462 (81%)	87%
GT	136 (18%)	67 (14%)	34 (21%)	102 (18%)	12%
TT	8 (1%)	3 (1%)	0	8 (1%)	1%
G	1316 (0,90)	887 (0,93)	290 (0,90)	1026 (0,90)	0,93
T	152 (0,10)	73 (0,07)	34 (0,10)	118 (0,10)	0,07

6. Niveles de ARNm de *SNCA* en tejido cerebral

La cuantificación de los niveles de las 4 isoformas predominantes del gen *SNCA*: *SNCA*-140, -126, -112 y -98, se realizó mediante PCR semicuantitativa a tiempo real sobre ARN obtenido de tejido cerebral de tres regiones (SN, CB y CO) de donantes con EP (N=9) y sin patología cerebral (N=6). Los donantes enfermos habían sido diagnosticados clínica y patológicamente (autopsia) (**Tabla 13**).

La secuenciación de los exones 2-5 del gen *SNCA* y de los exones 31 y 41 del gen *LRRK2* mostró que ninguno de los donantes era portador de variantes patogénicas en estos exones. Los tres genotipos de rs356165 estaban presentes en los pacientes (2 AA, 4 AG y 3 GG), y de los controles 3 eran AA y 3 AG. Para el SNP rs11931074 todos los donantes menos uno eran homocigotos GG (**Tabla 13**).

Tabla 13. Características de los donantes de tejidos.

código	estatus	género	edad	IPM	EI	tejidos	LRRK2/ SNCA	rs356165/ rs11931074	microscopía	autopsia
A143-00	EP	M	89	54	ND	SN,CB,CO	N	AG/GG	Pérdida neuronal y CL en SN	1-EP;2-ECV
A350-96	EP	M	85	9	83	SN,CB,CO	N	AA/GG	Pérdida neuronal y CL en mesencéfalo, estructuras fibrilares ubiquitina +	1-EP y EA
A236-95	EP	V	73	40	ND	SN,CB,CO	N	GG/GG	Pérdida neuronal y CL en SN	EPI
A040-95	EP	M	80	72	76	SN,CB,CO	N	AA/GG	Pérdida neuronal y CP en la SN y CL en LC	EP y AMS
A391-94	EP	V	59	23	ND	SN,CB,CO	N	AG/GG	Pérdida neuronal y CL en SN y LC	EPI
A323-94	EP	V	74	10	68	SN,CB,CO	N	GG/GT	Pérdida neuronal, CL en el mesencéfalo y pons	1-EP;2-ECV menor
A044-94	EP	M	81	38	76	SN,CB,CO	N	GG/GG	Pérdida neuronal, CL en la SN y LC	EP
A248-93	EP	M	73	82	62	SN,CB,CO	N	AG/GG	CL y CP en la SN	EP
A117-93	EP	M	76	47	74	SN,CB	N	AG/GG	Pérdida neuronal, CL y CP en la SN y LC	EP
A127-11	CNT	V	73	23		SN,CB,CO	N	AG/GG		cerebro adulto normal
A356-99	CNT	M	67	24		SN,CO	N	AA/GG		cerebro adulto normal
A130-09	CNT	V	54	31		SN,CB,CO	N	AA/GG		cerebro adulto normal
A011-06	CNT	M	82	43		SN,CB,CO	N	AG/GG		cerebro adulto normal
HUCA1	CNT	V	64	5		SN,CB,CO	N	AG/GG		cerebro adulto normal
HUCA2	CNT	V	86	5,5		SN,CB,CO	N	AA/GG		cerebro adulto normal

EP: Enfermo de Parkinson, CNT: control sano, M: mujer, V: varón, ND: no disponible, SN: Sustantia Nigra, CB: cerebelo, CO: córtex occipital, N: normal, CL: cuerpos de Lewy, CP: cuerpos pálidos, LC: locus coeruleos, ECV: enfermedad cerebrovascular, AMS: atrofia multisistémica; IPM=Intervalo *postmortem*.

Los donantes con EP presentaba una edad media de $76,7 \pm 8$ años, con un intervalo *postmortem* (IPM) de $41,6 \pm 25$ horas, y el 33% eran varones. El grupo de donantes sanos tenía una edad media de 71 ± 11 años, un IPM de $21,9 \pm 13$ horas, y el 67% eran varones. No había diferencias estadísticas significativas para estas variables entre los dos grupos.

RESULTADOS

La amplificación de los ADNc con cebadores específicos para cada isoforma dio lugar a un solo fragmento del tamaño esperado, cuya especificidad se confirmó mediante secuenciación (**Figura 18**).

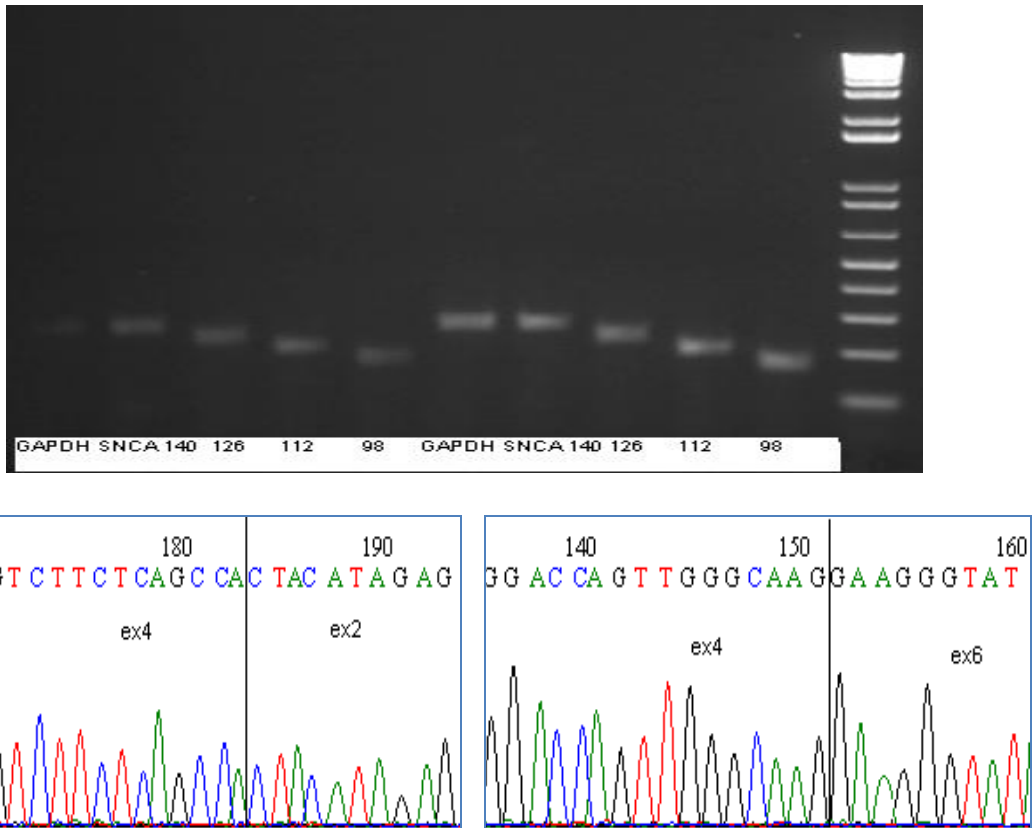


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los amplicones del gen constitutivo (*GAPDH*) y de *SNCA* (imagen superior). Secuencias mostrando el empalme directo de los exones 2-4 y 4-6, en los fragmentos carentes de los exones 3 y 5 (imagen inferior).

La comparación de los niveles de expresión relativa de los transcritos en la SN no mostró diferencias entre la SN de pacientes y donantes sanos, si bien se observaron mayores niveles de la isoforma *SNCA*-98 en los pacientes ($p=0,06$) (**Figura 19**). Cuando comparamos los niveles según el genotipo del SNP rs356165, no hallamos diferencias de expresión entre las muestras con genotipos AA y AG+GG (**Figura 19**).

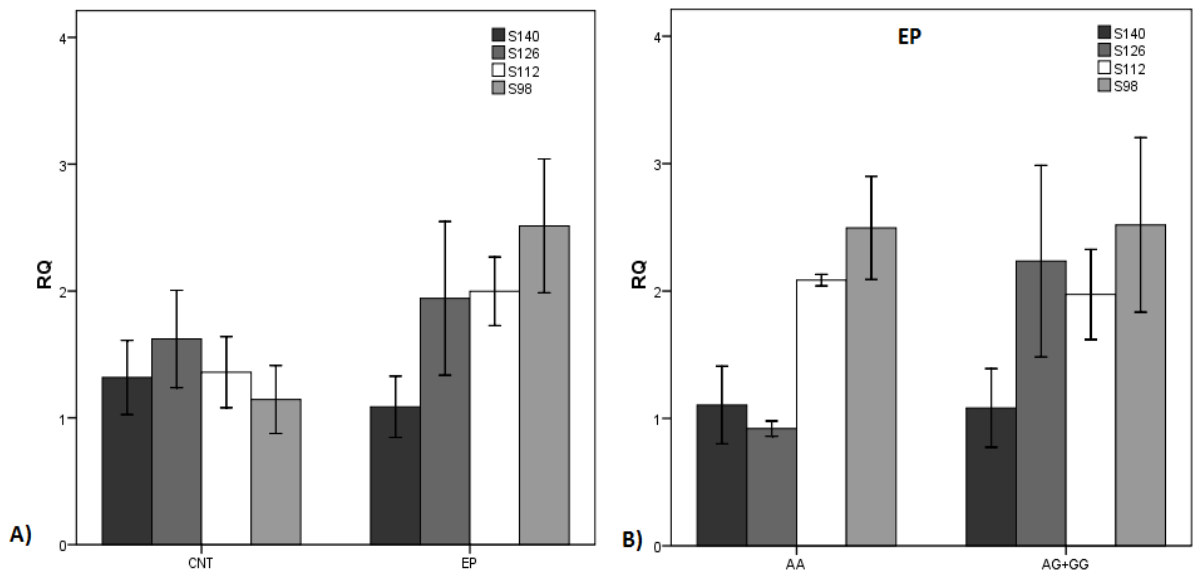


Figura 19. A) Niveles relativos de los transcritos en la SN de EP y donantes sanos y **B)** según el genotipo rs356165 en los pacientes.

Realizamos el mismo análisis en las otras dos regiones cerebrales, CO y CB. En el córtex (CO) no observamos diferencias significativas para ninguna de las 4 isoformas, mientras que en CB había diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles para los niveles de expresión de los transcritos cortos *SNCA-112* y *SNCA-98* ($p=0,02$ y $p=0,03$) y para *SNCA-140* ($p=0,04$) (**Figura 20**).

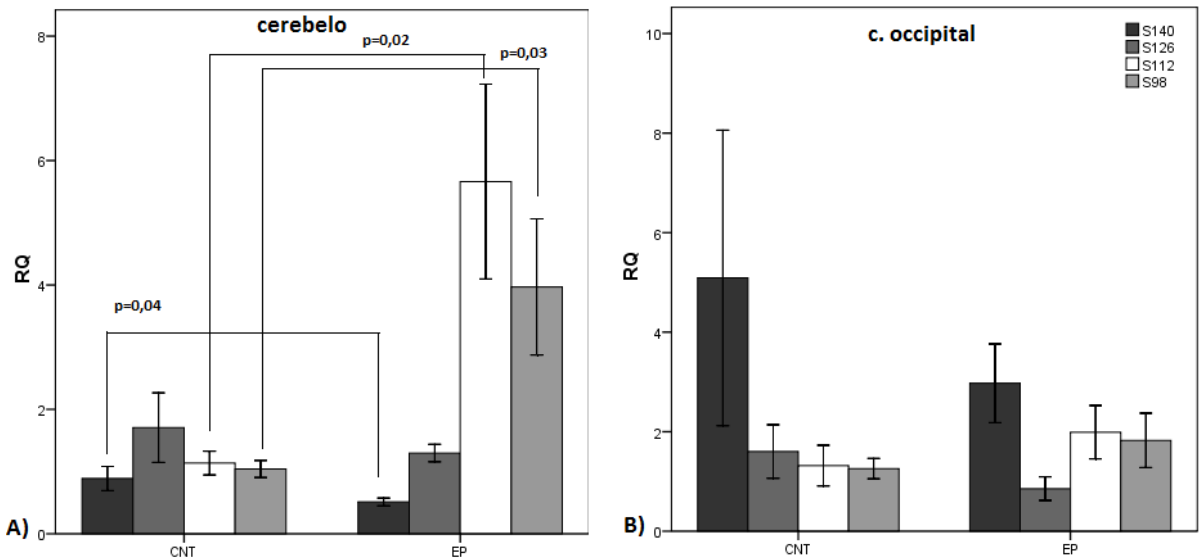


Figura 20. Niveles relativos de los transcritos en CB (A) y CO (B) de EP y donantes sanos.

Por su parte, la comparación entre los genotipos no mostró diferencias en las dos regiones cerebrales.

Finalmente, comparamos los niveles de los transcritos entre las tres regiones cerebrales en los pacientes, y hallamos menor expresión de *SNCA*-140 en CB ($p=0,003$) con incremento de las isoformas menores. Sin embargo, en los controles no observamos diferencias entre las tres regiones cerebrales (**Tabla 14**).

Tabla 14. Niveles relativos de los cuatro transcritos en la SN, CB y OC de pacientes y controles. Se indica el p-valor de la comparación entre tejidos (Kruskal-Wallis).

EP	SNCA-140	SNCA-126	SNCA-112	SNCA-98
SN	1,1±0,7	1,9±1,8	2±0,8	2,5±1,6
CB	0,5±0,2	1,3±0,4	5,7±4,7	4±3,3
CO	3±2,2	0,8±0,7	2±1,5	1,8±1,5
p-valor	0,003	0,168	0,048	0,138
controles	SNCA-140	SNCA-126	SNCA-112	SNCA-98
SN	1,3±0,7	1,6±0,9	1,4±0,7	1,1±0,6
CB	0,9±0,4	1,7±1,2	1,1±0,4	1±0,3
CO	5,1±7,3	1,6±1,3	1,3±0,9	1,2±0,5
p-valor	0,731	0,98	0,773	0,762

7. Variación en la región 3' UTR del gen *LRRK2*

La variación en la región 3'UTR del gen *LRRK2* se determinó mediante SSCA en 743 pacientes y 523 controles de la cohorte de Asturias. Hallamos 12 variantes, 11 cambios de un solo nucleótido y una delección de una base (**Tabla 15**). Cinco de los cambios eran polimorfismos ya descritos y frecuentes en los pacientes y controles, y 7 eran variantes raras, 2 no descritas (c.*130_131del y c.*1382C>A) y 4 presentes sólo en los enfermos (**Tabla 15, Figura 21**).

La comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas entre pacientes y controles no mostró diferencias significativas para los polimorfismos rs10878441, rs3886747, rs1365770 y rs10784548. Hallamos diferencias en la frecuencia de los genotipos del SNP rs66737902 (TT vs TC+CC; p=0,005; OR=1,47, 95%CI=1,12-1,92). Este efecto se mantuvo tras corregir por edad y sexo (p=0,01; OR=1,47; 95%CI=1,09-1,97) (**Tabla 16**). En la

RESULTADOS

comparación entre los grupos de pacientes con inicio temprano y tardío no observamos diferencias significativas en las frecuencias entre los grupos (**Tabla 16**).

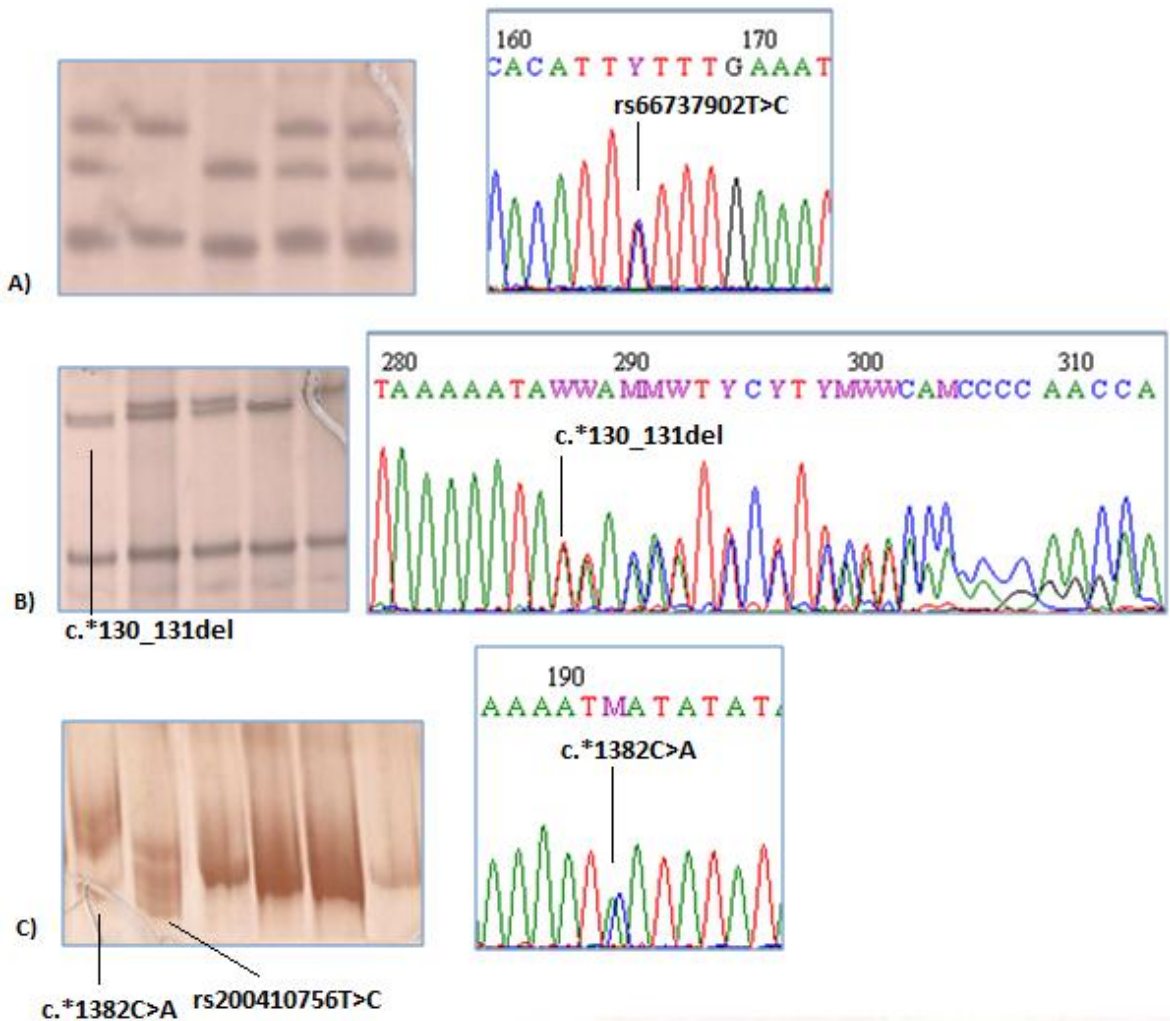


Figura 21. A) Patrones SSCA y secuencias del SNP rs66737902 T>C, B) de la delección c.*130_131delT y C) de la variante rs200410756T>C.

Tabla 15. Variantes halladas en la región 3'UTR del gen *LRRK2* y posición en el cromosoma y frecuencia de los alelos "raros".

Variante	SNP id	Posición	Frecuencia
T>C	rs66737902	12:40761663	EP=0,15/CNT=0,11
G>A	rs139288753	12:40761677	1EP
Del T	c.*130_131del	12:40761697	3EP/3CNT
T>C	rs202205832	12:40761715	1PE
A>C	rs10878441	12:40761931	C=0,65/C=0,62
C>T	rs3886747	12:40761951	T=0,65/T=0,62
G>T	rs200678400	12:40762037	1EP/1CNT
G>C	rs1365770	12:40762303	C=0,66/C=0,68
T>C	rs10784548	12:40762546	C=0,49/C=0,49
C>A	c.*1382C>A	12:40762949	2EP
T>C	rs200410756	12:40762955	1EP
T>A	rs12422278	12:40763013	2EP/5CNT

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs66737902 en la población de Asturias.

rs66737902	PD (N=743)	CNT (N=523)	EO-PD (N=129)	LO-PD (N=614)	1000 genomas
TT	543 (73%)	418 (80%)	94 (73%)	449 (73%)	77%
TC	183 (25%)	94 (18%)	33 (26%)	150 (25%)	20%
CC	17 (2%)	11 (2%)	2 (1%)	15 (2%)	3%
T	1269 (0,85)	930 (0,89)	0,86	0,85	0,87
C	217 (0,15)	116 (0,11)	0,14	0,15	0,13

Estudiamos la distribución de las frecuencias del polimorfismo rs66737902 en los portadores de alguna de las dos variantes patogénicas en *LRRK2*. De los 16 portadores p.G2019S, 13 eran homocigotos rs66737902 TT y 3 heterocigotos TC; de los portadores p.R1441G, 14 eran TC y 1 TT. El DL entre este polimorfismo y p.R1441G era $D'=0,9$, por lo que el riesgo observado para rs66737902-C podría deberse al “arrastre” por la mutación. Sin embargo, tras eliminar los 15 portadores p.R1441G del estudio, las diferencias entre pacientes y controles se mantuvieron significativas ($p=0,03$; $OR=1,31$; $95\%CI=1,02-1,67$).

Finalmente, analizamos el posible impacto de cambio nucleotídico T>C del polimorfismo rs66737902 y de las variantes raras encontradas con frecuencia <1% (programa SNPfold). Para todas las variantes el coeficiente de correlación obtenido fue $>0,9$ ($P>0,05$) lo cual indica que la accesibilidad de la hebra de ARN no se ve modificada por el cambio de nucleótido.

8. Regulación de la expresión de *LRRK2* mediada por miRNAs

Nos planteamos investigar si la asociación del alelo rs66737902-C y la EP podría ser explicada por un efecto sobre la unión de algún miRNA. En primer lugar determinamos qué miRNAs se podrían unir a las dos secuencias 3'UTR en el entorno de este SNP, mediante programas informáticos. miR-138.2-3p (*) era el que tenía el mayor valor de unión (**Figura 23**). Además, el miRNA maduro se expresaría de forma importante en el cerebro normal (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw>). Cuantificamos la expresión de miR-138.2-3p en nuestras muestras de SN tanto de paciente como de controles sanos (Ct $29,6\pm 1,7$ vs $29,3\pm 0,9$).

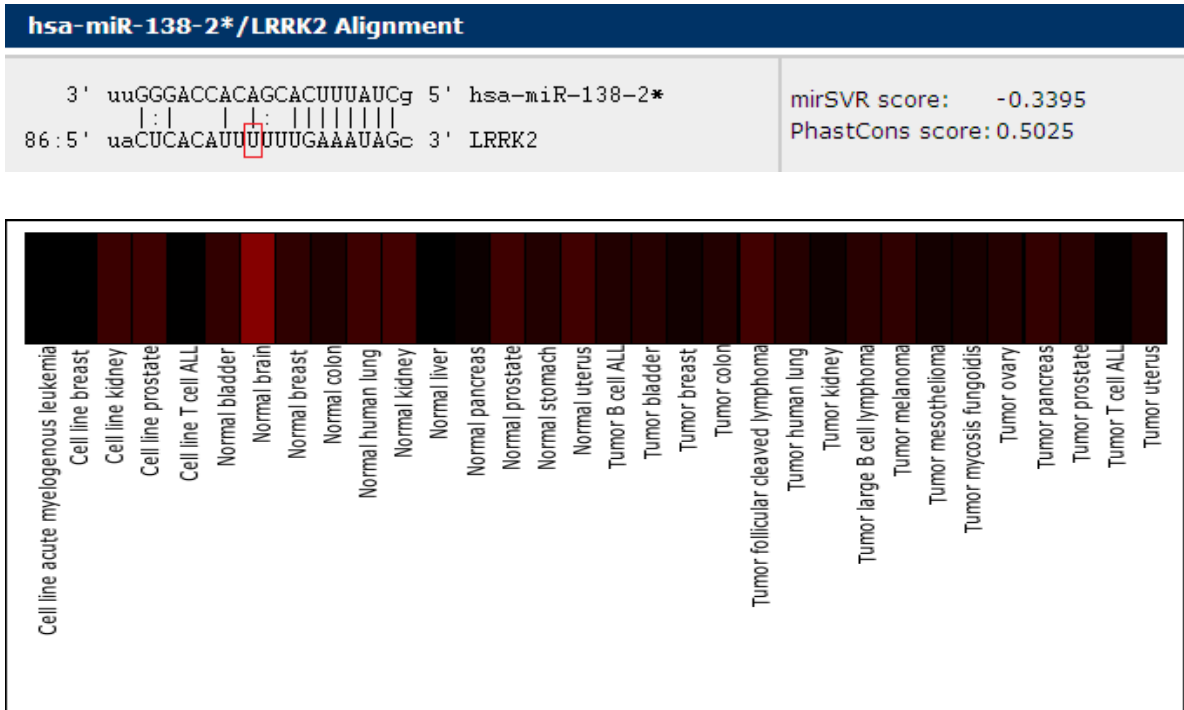


Figura 23. Secuencia de miR-138.2-3p (*) mostrando las bases complementarias con la 3'UTR de *LRRK2* en el entorno de la base polimórfica rs66737902 (enmarcada en rojo). Predicción según el programa microRNA.org. Figura inferior, niveles de de miR-138.2-3p en diferentes tejidos (gradiente de negro, no expresión, a rojo, expresión elevada; <http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/>).

Construimos vectores reporteros-luciferasa para miR-138.2-3p y miR-205 (como miRNA control para confirmar la regulación de la expresión). La transfección se optimizó ensayando diferentes concentraciones de un vector reportero para GFP (Green Fluorescent Protein) y visionando las células HEK-293 con microscopía de fluorescencia (**Figura 24A**). Para fijar las condiciones probamos concentraciones crecientes de miR-205, desde 25 ng a 300 ng del vector, y cuantificamos la expresión del miRNA maduro por PCR en tiempo real (**Figura 24B**).

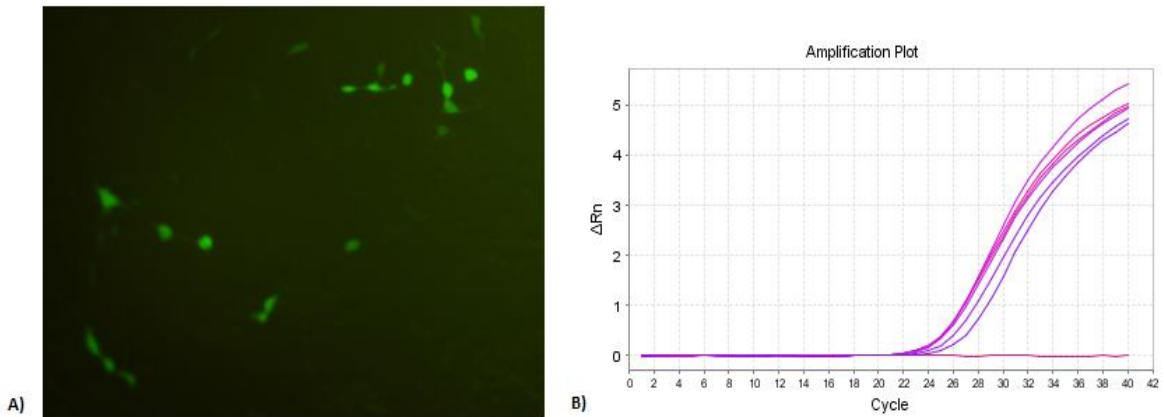


Figura 24. A) Microscopía de fluorescencia de células HEK-293 transfectadas con GFP. **B)** Cuantificación de miR-205 a concentraciones crecientes mediante PCR a tiempo real.

Seguidamente, transfectamos células HEK-293 con 100 ng del vector reportero de luciferasa acoplado a la secuencia 3'UTR de *LRRK2*, y del vector reportero con el pre-miRNA de miR-205 (cuatro concentraciones entre 0 y 300 ng). Realizamos ensayos en paralelo y con las mismas condiciones para el reportero de *LRRK2* y cotransfectando con el pre-miR-138.2-3p. Cada condición se ensayó por triplicado y en tres ensayos independientes, y se comparó la expresión de luciferasa relativa a renilla con la de células que sólo se habían transfectado con el vector luciferasa-3'UTR. Confirmamos que miR-205 sería un regulador de la expresión de *LRRK2* a concentraciones >150 ng, pero no encontramos diferencias significativas entre las células transfectadas o no con el pre-miR-138.2-3p (**Figura 25**).

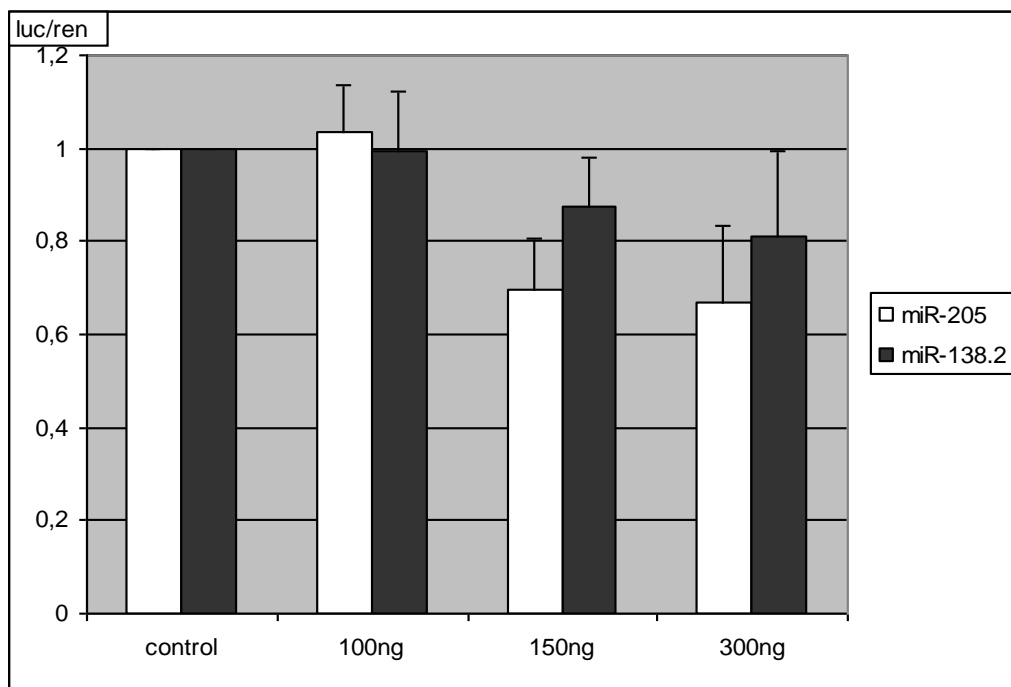


Figura 25. Expresión relativa luciferasa / renilla obtenida a partir de las células transfectadas con varias concentraciones de pre-miR-138.2-3p y pre-miR-205. Los valores se normalizaron frente a la expresión de células transfectadas con el vector reportero luciferasa-3'UTR de *LRRK2*.

9. Niveles de ARNm de *LRRK2* en tejido cerebral

Cuantificamos los niveles de ADNc de *LRRK2* en el tejido cerebral de los pacientes con EP (N=9) y donantes sanos (N=5) (ver **Tabla 13**). No hallamos diferencias entre los dos grupos para las tres regiones cerebrales (**Figura 22A**). Sin embargo, encontramos diferencias en la expresión relativa de *LRRK2* en la SN de los pacientes según fuesen o no portadores del alelo de riesgo rs66737902 C; $p=0,011$ (EP: 5TT y 4TC, controles: 4TT y 1TC) (**Figura 22B**).

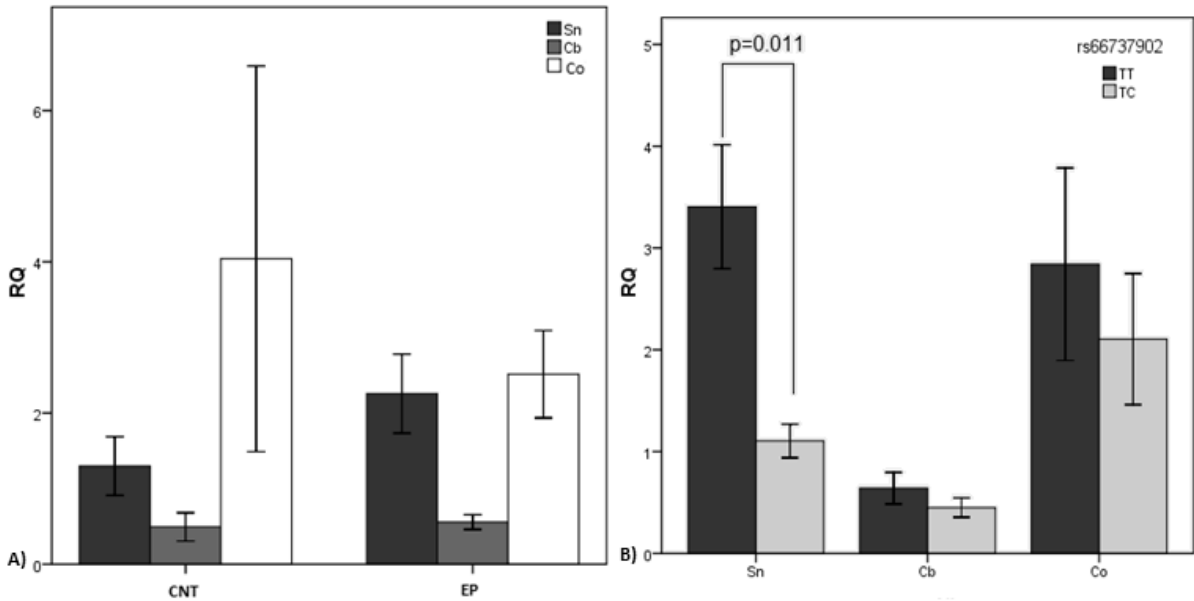


Figura 22. A) Niveles de expresión del ARNm de *LRRK2* en SN, CB y CO de donantes sanos y pacientes con EP. **B)** Niveles de expresión del ARNm de *LRRK2* en Sn, CB y CO de los enfermos según su genotipo rs66737902 (TT= 5; TC= 4).

Así mismo, la comparación de expresión de *LRRK2* entre tejidos, mostró una expresión diferencial entre las tres regiones cerebrales en el caso de los enfermos ($p=0,001$) y una ausencia de variabilidad en los controles ($p=0,18$).

10. Perfil de expresión de miRNAs en tejido cerebral

Estudiamos la expresión de miRNAs en la SN de los donantes de tejido, mediante PCR en tiempo real en placas TLDA y el uso de sondas Taqman. En primer lugar, extrajimos ARN de bajo peso molecular de la SN de 10 pacientes y 4 donantes sanos, cuyas características se describieron previamente (**Tabla 13**).

Como controles endógenos se seleccionaron los ARN pequeños RNU-44 y U6sn, ambos globalmente validados para los estudios en tejido y para los cuales comprobamos que la expresión en nuestra muestra era estable tanto intra como inter grupo (**Figura 26**).

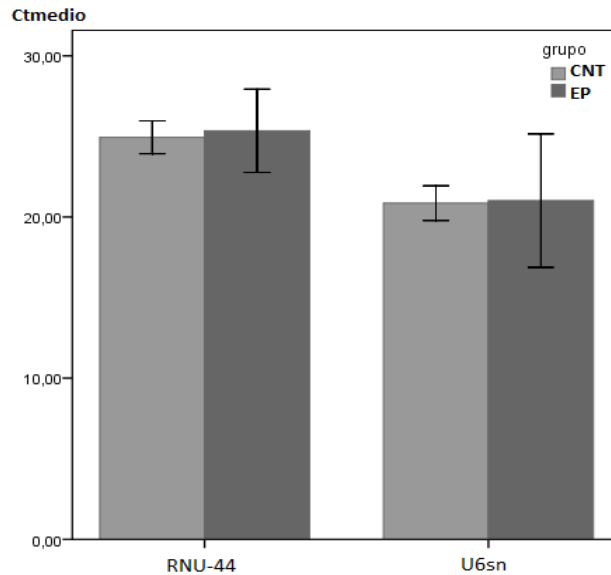


Figura 26. Ciclos medios de amplificación para los controles endógenos RNU-44 y U6sn en las muestras de SN. No había diferencias en los niveles de expresión ni inter ni intra grupo.

Una vez determinado el perfil de expresión de los 733 miRNAs humanos contenidos en las dos placas TLDA, observamos que los enfermos presentaban una menor expresión global de miRNAs frente a la observada en los donantes sin neuropatología.

ΔCt : Ct miRNA problema-Ct control endógeno

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ muestra problema- ΔCt promedio controles

$RQ (FC) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

RESULTADOS

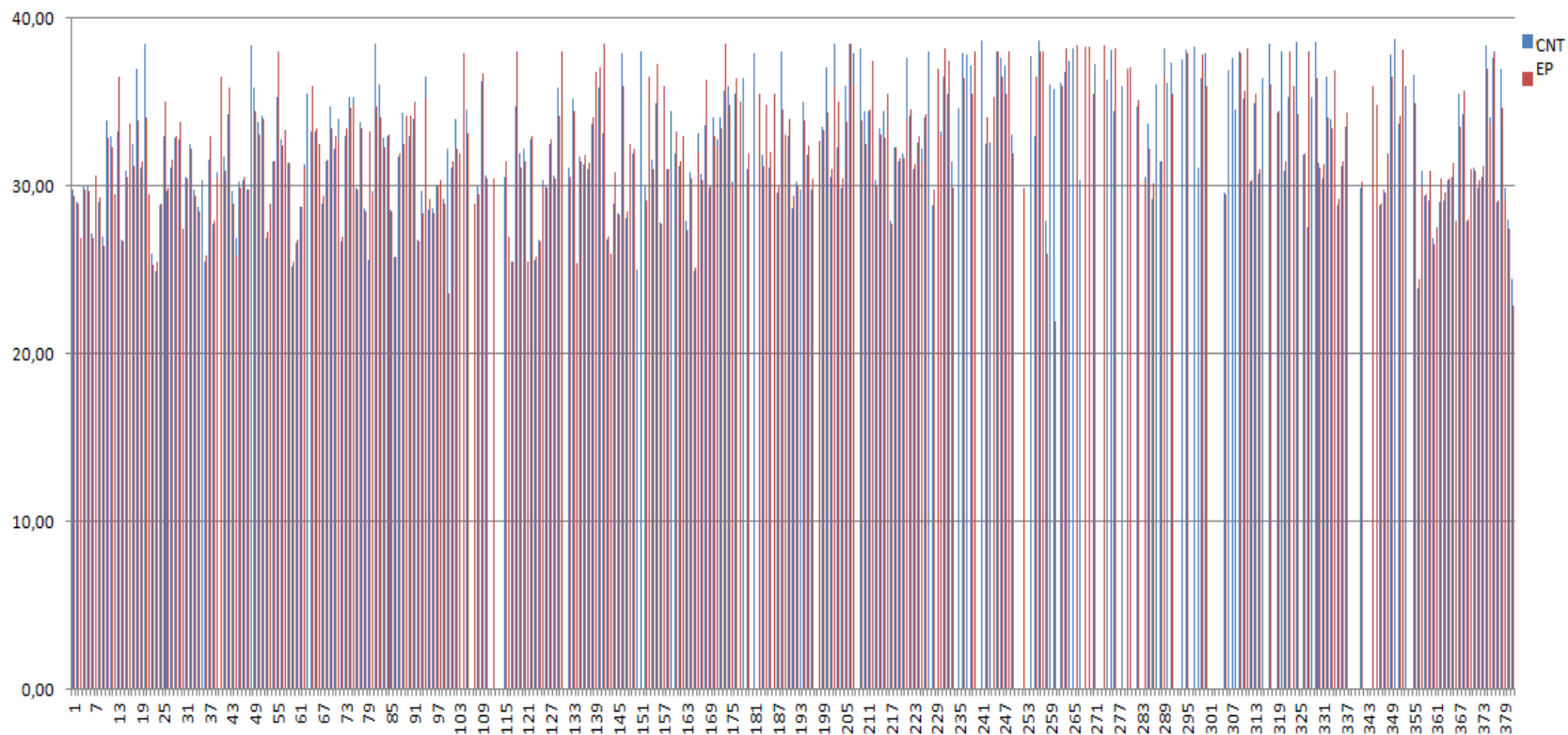


Figura 27. Perfil promedio de expresión, representado mediante el ciclo de superación del nivel umbral de expresión (Ct), de los miRNAs englobados en la TLDA-A, para los pools de SN de EP y controles.

RESULTADOS

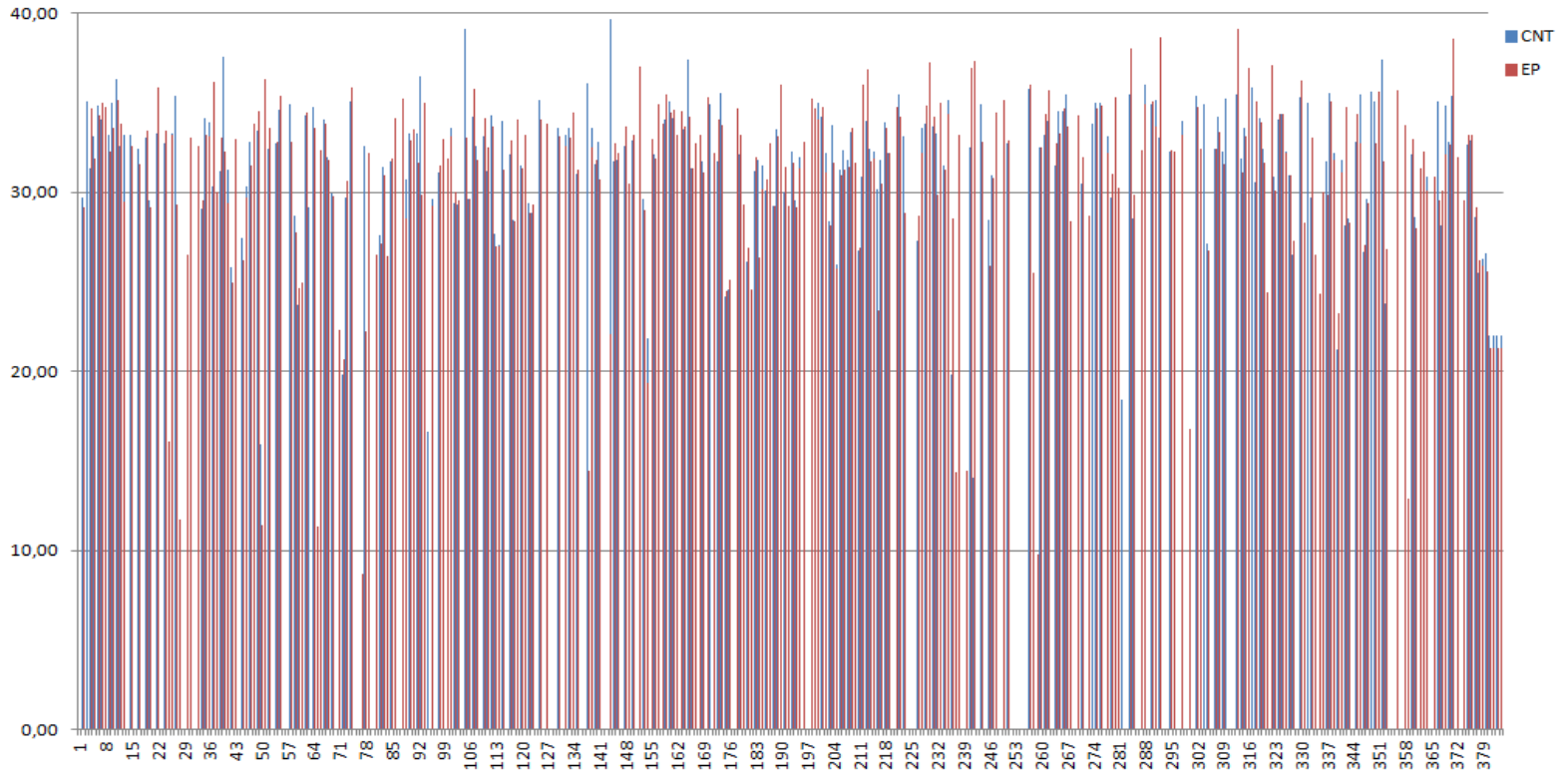


Figura 28. Perfil promedio de expresión, representado mediante el ciclo de superación del nivel umbral de expresión (Ct), de los miRNAs englobados en la TLDA-B, para los pools de SN de EP y controles.

RESULTADOS

Los siguientes miRNAs presentaban una expresión media significativamente ($p < 0,05$) mayor o menor en la SN de los enfermos: miR-369-3p y miR-450b-3p (sobrexpresados) y miR-136, miR-337-5p, miR-508-5p, miR-548d y miR-579 (infraexpresados) (**Figura 29**).

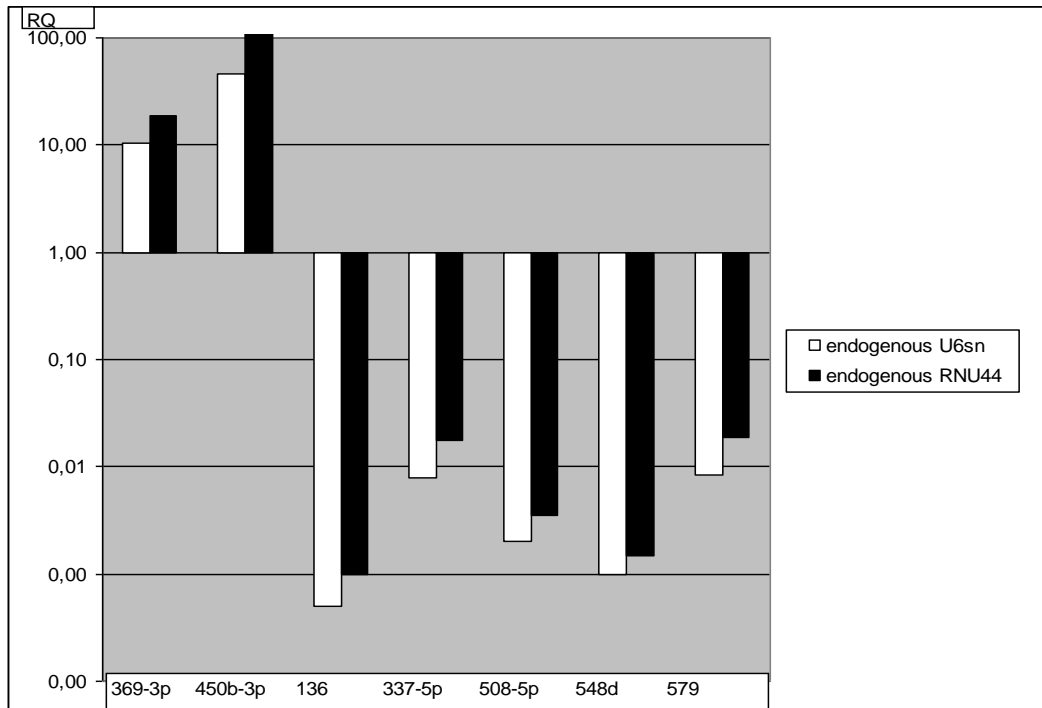


Figura 29. Valores de expresión media (RQ) de los 7 miRNAs, normalizados frente a RNU-44 y U6sn y relativizados frente a la expresión media en los controles (RQ=1).

Los 7 miRNAs candidatos se ensayaron con sondas TaqMan individuales en las 14 muestras de SN (10 pacientes y 4 controles) con RNU-44 como control endógeno. Cada muestra se analizó por duplicado y en tres ensayos independientes. Sólo miR-136 mostró diferencias significativas con $RQ = 0,18 \pm 0,15$ en enfermos y $0,50 \pm 0,32$ en controles ($p=0,025$) (**Figura 30**).

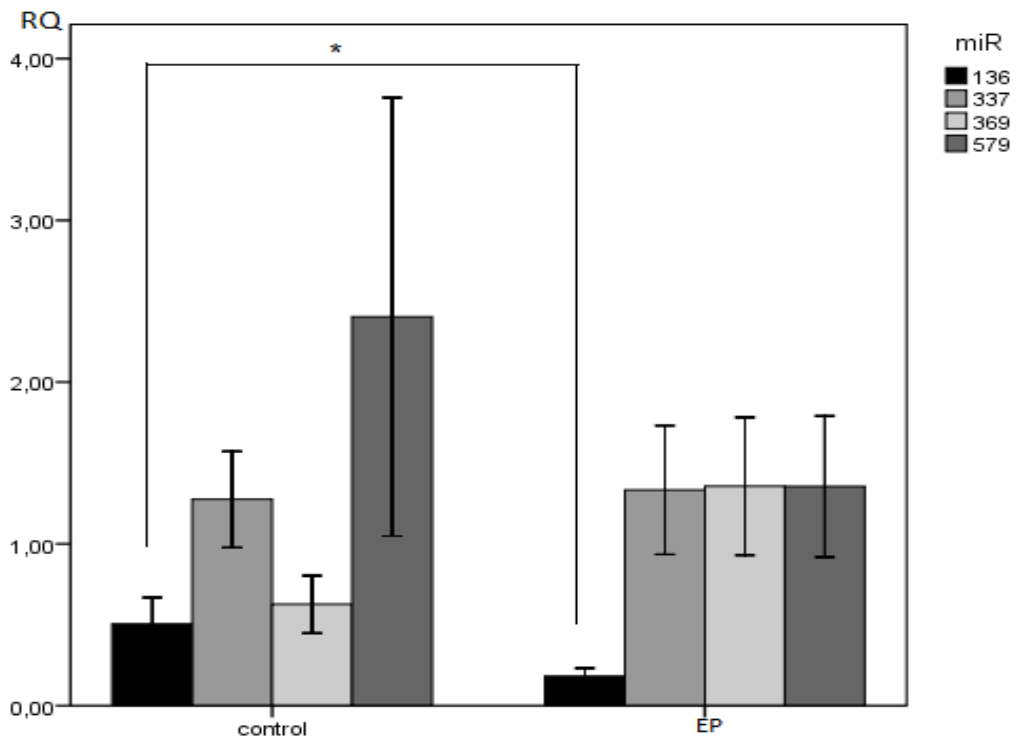


Figura 30. Expresión relativa (RQ) de miR-136, -337, -369-3p y 579 en la SN de pacientes y donantes sanos.

Los resultados obtenidos para miR-136 se confirmaron normalizando frente al control endógeno U6sn, con $RQ=0,37 \pm 0,2$ en enfermos y $0,81 \pm 0,28$ en controles ($p=0,014$).

Determinamos también los niveles de los 7 miRNAs candidatos en tejidos de CB (N=13) y CO (N=12). Para ninguno (incluyendo miR-136) observamos diferencias entre pacientes y controles (**Figura 31**).

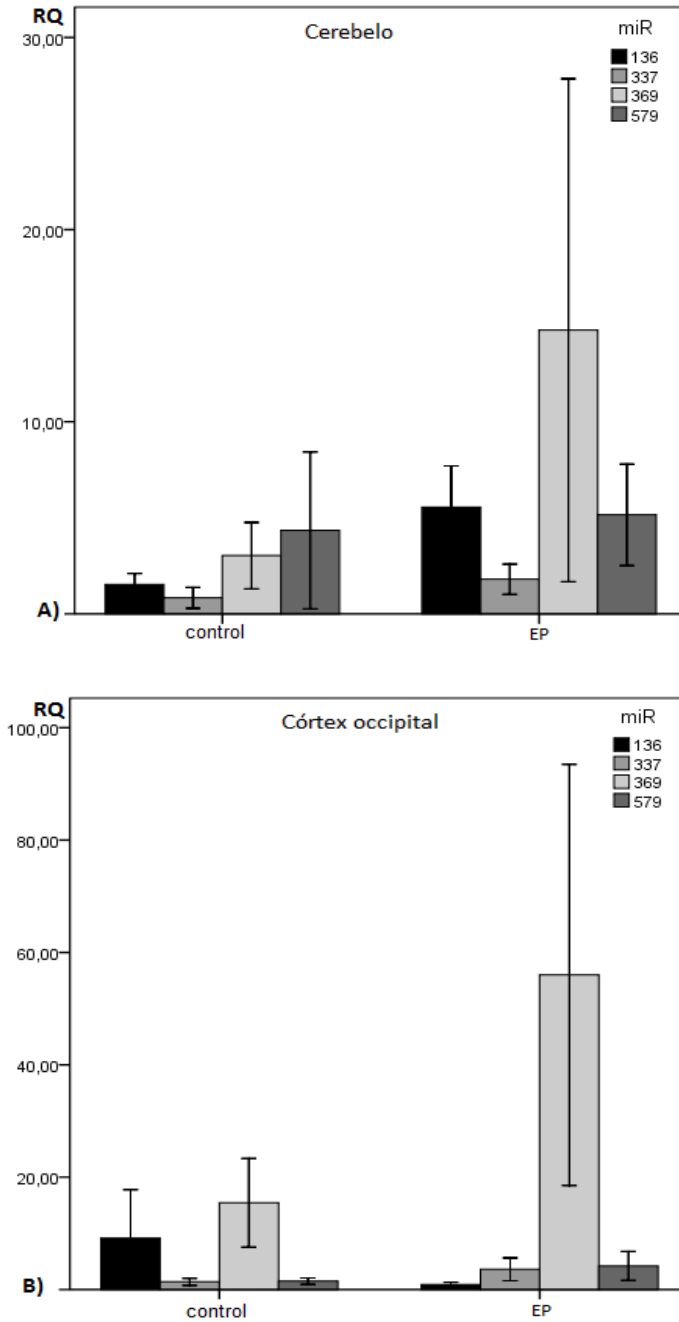


Figura 31. A) Expresión relativa (RQ) de los miRNAs miR-136, -337, -369-3p y 579 en el cerebelo y **B)** en córtex occipital de EP y CNT.

Determinamos si miR-136 presentaba una expresión dependiente de tejido. En el caso de los pacientes la mayor expresión relativa correspondía al CB, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$) frente a la SN que tenía la menor expresión (Figura 32).

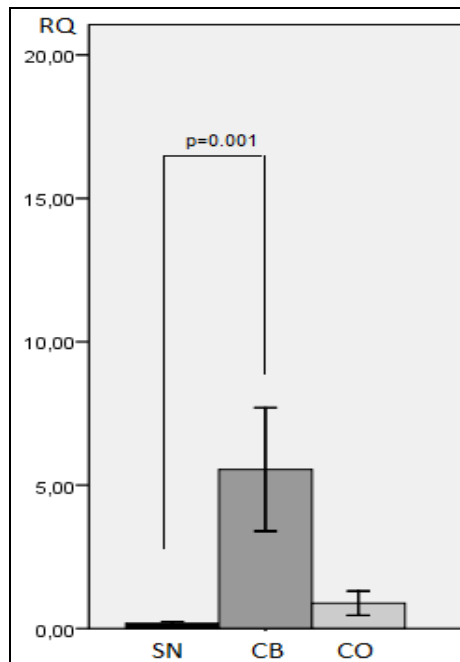


Figura 32. Niveles medios de expresión de miR-136 entre las tres regiones cerebrales de los pacientes con EP.

Por último, utilizamos el programa informático PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) para realizar una predicción de las posibles rutas fisiológicas relacionadas con la EP que podrían ser reguladas por miR-136, así como qué genes contendrían dianas para este miRNA y podrían ser regulados por él. Entre las rutas fisiológicas candidatas se encuentran varias previamente relacionadas con la EP, como las de señalización de la insulina, TGF- β o MAPK (Tabla 17).

Tabla 17. Posibles procesos fisiológicos a través de los cuales miR-136 podría ejercer su regulación y genes con 3'UTR diana susceptible de unión del miRNA Software de predicción utilizado PicTar, se muestran solo las rutas con $-\ln(p\text{-valor}) \geq 1$.

Proceso	Nombre del gen	Genes	$-\ln(p\text{-value})$
Insulin signaling pathway	PPARGC1A, ENSG00000143933, ELK1, EIF4E2	4	5.48
TGF-beta signaling pathway	SMAD6, GDF6, THBS2	3	4.61
GnRH signaling pathway	ENSG00000143933, MAPK14, ELK1	3	4.29
Cell adhesion molecules (CAMs)	VCAN, NEO1, NLGN3	3	3
MAPK signaling pathway	FOS, MAPK14, ELK1, MAP2K1IP1	4	2.19
Circadian rhythm	PER1	1	1.88
Caprolactam degradation	ASAHL	1	1.62
Toll-like receptor signaling pathway	FOS, MAPK14	2	1.27
Methionine metabolism	TRDMT1	1	1.26
Heparan sulfate biosynthesis	EXTL3	1	1.26
Parkinson's disease	UBE2G1	1	1.19

11. Perfil de expresión de miRNAs en el plasma de EP

Estudiamos el perfil de expresión de los 360 miRNAs humanos mejor caracterizados, en el plasma de pacientes y controles, mediante PCR en tiempo real y sondas Taqman en placas TLDA. Para ello obtuvimos el ARN del plasma de 31 pacientes con EP (edad media 64 ± 12 ; 55 % varones) y 25 controles sanos (edad media 67 ± 15 ; 52 % varones) (**Tabla 18**). Además, estudiamos 22 pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) (edad media 79 ± 4 ; 55 % varones). Como control del proceso de extracción se añadió a cada plasma el miRNA-Ath-159a, que fue cuantificado individualmente en cada

muestra y sólo aquellos plasmas con un ciclo de amplificación entre 20 y 26 se consideraron válidos (**Figura 32A**). Como control endógeno de normalización empleamos miR-191, ya que ha sido empleado en estudios de plasma sanguíneo y presentaba niveles similares en todas las muestras analizadas (**Figura 32B**).

Tabla 18. Características de los individuos EP, control (CNT) y EA incluidos en el estudio.

código	edad	sexo	inicio	código	edad	sexo	código	edad	sexo
EP1	35	V	EO	CNT1	30	M	EA1	70	V
EP2	42	V	EO	CNT2	33	V	EA2	72	V
EP3	42	V	EO	CNT3	42	M	EA3	73	M
EP4	48	M	EO	CNT4	48	V	EA4	77	V
EP5	49	V	LO	CNT5	49	M	EA5	77	M
EP6	53	V	EO	CNT6	58	V	EA6	77	V
EP7	54	V	EO	CNT7	66	M	EA7	77	M
EP8	58	V	EO	CNT8	69	M	EA8	78	V
EP9	59	V	EO	CNT9	70	M	EA9	79	V
EP10	60	M	EO	CNT10	70	V	EA10	79	M
EP11	65	V	LO	CNT11	71	M	EA11	79	V
EP12	65	M	LO	CNT12	71	M	EA12	79	M
EP13	66	M	LO	CNT13	74	M	EA13	80	V
EP14	67	V	LO	CNT14	75	V	EA14	80	M
EP15	67	V	LO	CNT15	76	V	EA15	81	V
EP16	68	V	LO	CNT16	77	V	EA16	82	M
EP17	71	M	LO	CNT17	77	V	EA17	82	M
EP18	71	V	LO	CNT18	77	V	EA18	82	V
EP19	72	V	LO	CNT19	78	M	EA19	82	M
EP20	74	M	LO	CNT20	78	V	EA20	82	V
EP21	75	M	LO	CNT21	78	M	EA21	83	M
EP22	76	M	LO	CNT22	80	V	EA22	83	M
EP23	76	M	LO	CNT23	81	V	EA23	84	V
EP24	78	M	LO	CNT24	81	M			
EP25	83	M	LO	CNT25	81	V			
EP26	53	M	EO						
EP27	73	M	LO						
EP28	76	V	LO						
EP29	73	M	LO						
EP30	67	V	EO						
EP31	66	M	EO						

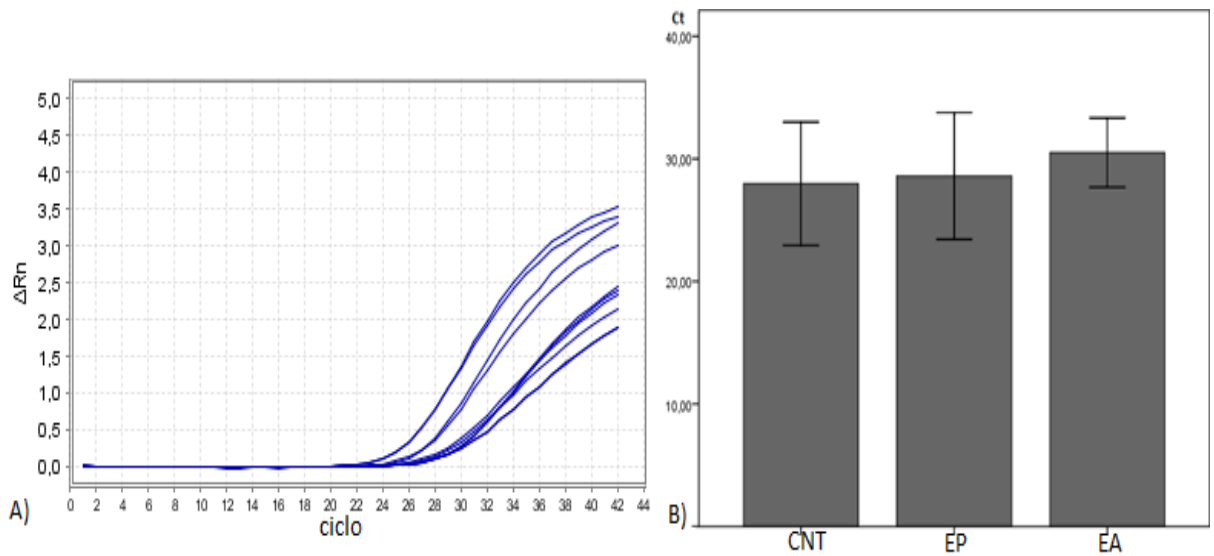


Figura 32. A) Amplificación en tiempo real del miR-ath-159a. **B)** valores medios de Ct de miR-191 en los controles y pacientes con EP y EA (ANOVA, $p > 0,05$).

La cuantificación inicial de los miRNAs en los pacientes con EP y controles se realizó sobre 3 mezclas (pooles) de cuatro muestras de EP y 3 mezclas de 4 muestras de controles que se cargaron en 6 arrays TLDA-A. La expresión de los miRNAs se analizó mediante el método $\Delta\Delta Ct$ con los controles como referencia de expresión:

ΔCt : Ct miRNA problema-Ct miR-191

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt muestra problema- ΔCt pool control

$RQ (FC) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

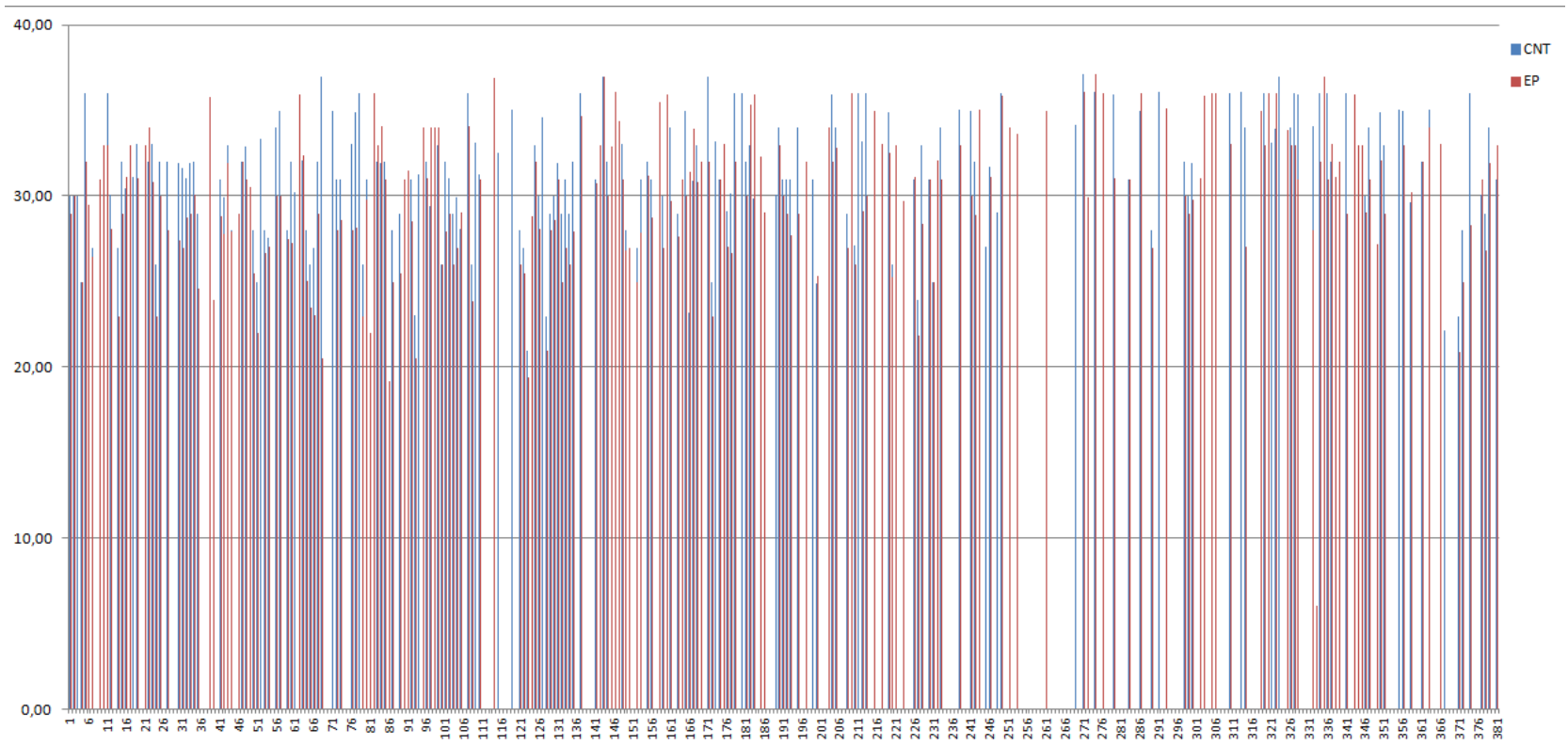


Figura 33. Perfil promedio de expresión, representado mediante el ciclo de superación del nivel umbral de expresión (Ct), de los miRNAs englobados en la TLDA A, para los pools de EP y controles.

Tras analizar los resultados obtenidos con el análisis de los pools (**Figura 33**), los siguientes miRNAs estaban sobre o infra-representados en el plasma de los pacientes: miR-125a-3p, -137, -181c, -193a-3p, -196b, -331-5p y -454 (**Tabla 19**). Estos miRNAs fueron cuantificados individualmente en cada plasma de pacientes (n=31) y controles (n=25). Únicamente miR-331-5p mostró diferencias significativas (valores Ct medios) entre los dos grupos: EP= $26,9 \pm 2,8$ vs CT= $30,6 \pm 3$ ($p \leq 0,0001$) (**Figura 34**). El mismo resultado se obtuvo para los valores RQ, siendo miR-331-5p el único con diferencias significativas con una expresión relativa $>20X$ en EP frente a controles ($p=0,001$) (**Figura 35**).

Tabla 19. MiRNAs con niveles plasmáticos diferentes (Ct medio en los pools) entre pacientes EP y controles sanos.

miRNA	mediaCt CNT	mediaCt EP
hsa-miR-125a-3p-4395310	>40	32,97
hsa-miR-137-4373301	>40	23,91
hsa-miR-181c-4373115	37,00	20,49
hsa-miR-193a-3p-4395361	>40	21,96
hsa-miR-196b-4395326	>40	19,18
hsa-miR-331-5p-4395344	>40	30,93
hsa-miR-454-4395434	>40	29,70

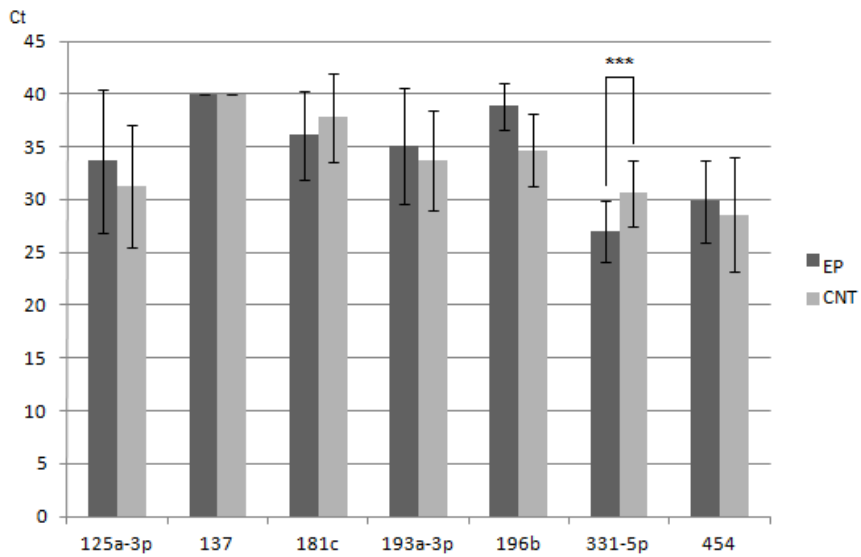


Figura 34. Valores medios de Ct de los 7 miRNAs candidatos en los pacientes EP y controles. Únicamente miR-331-5p mostró diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,0001$, U de Mann-Whitney).

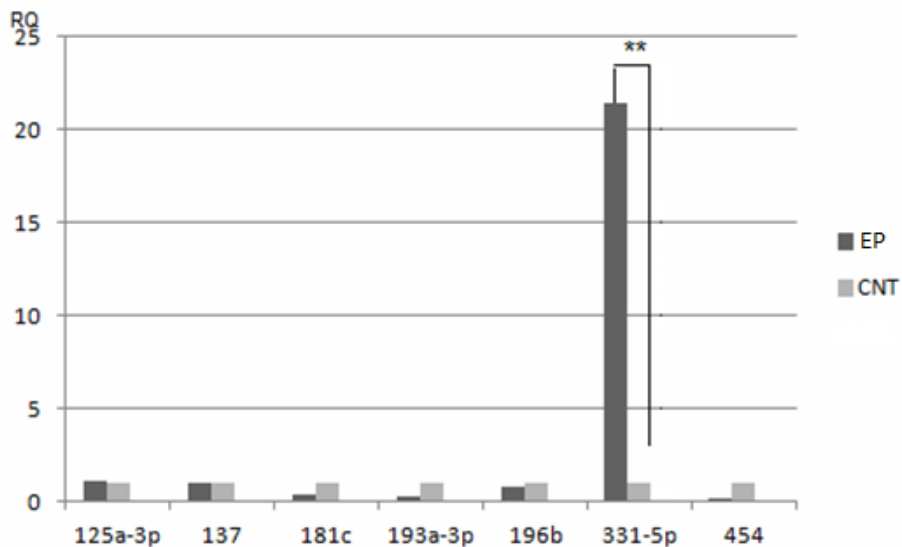


Figura 35. Expresión relativa (RQ) de los 7 miRNAs candidatos, normalizada frente a la expresión del grupo control. Únicamente miR-331-5p mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,001$, U de Mann-Whitney).

La expresión de miR-331-5p se cuantificó en el grupo con EA, hallando niveles similares a los del grupo control y menores que los hallados en los EP (Ct medio, $p < 0,0001$; RQ medio, $p = 0,006$).

Este miRNA fue también cuantificado sobre ARN total de leucocitos de EP (N=11) y controles (N=5), sin hallar diferencias entre ambos grupos ($p = 0,28$). Este resultado indica que las diferencias halladas entre el plasma de ambos grupos probablemente no se deben a una mayor liberación de miR-331-5p por los leucocitos de pacientes.

Por último, analizamos la posible implicación de miR-331-5p con la EP a nivel fisiológico y de regulación génica mediante el uso del software online Diana Lab (**Tabla 20**), encontrando una posible implicación en procesos previamente relacionados con la enfermedad.

Tabla 20. Posibles procesos fisiológicos a través de los cuales miR-331-5p podría ejercer su regulación y genes con 3'UTR diana susceptible de unión del miRNA. Software utilizado microT_4 Diana Lab, se muestran solo las rutas con $-\ln(p\text{-valor}) \geq 1$.

Proceso	Nombre del gen	Genes	$-\ln(p\text{-valor})$
Axon guidance	SRGAP3, EPHA4, GNAI1	3	4.35
Insulin signaling pathway	PPARGC1A, SHC3, PPP1R3A	3	3.77
Chronic myeloid leukemia	SHC3, SMAD4	2	2.75
TGF-beta signaling pathway	SMAD6, SMAD4	2	2.24
Keratan sulfate biosynthesis	B3GNT1	1	2.12
Alkaloid biosynthesis II	MYST4	1	1.67
Glycosphingolipid biosynthesis - neolactoseries	B3GNT1	1	1.5
MAPK signaling pathway	ATF2, MEF2C, DUSP1	3	1.49
1- and 2-Methylnaphthalene degradation	MYST4	1	1.43
Tight junction	CASK, GNAI1	2	1.25
Phenylalanine metabolism	MYST4	1	1.19
Benzoate degradation via CoA ligation	MYST4	1	1.14
Limonene and pinene degradation	MYST4	1	1.09
Aminosugars metabolism	GNPDA2	1	1.09

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopas**Discusión**cvbnm
qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

DISCUSIÓN

Las formas mendelianas monogénicas de la EP sólo “explican” el 10-15 % de los casos, y el porcentaje restante se engloba dentro de la categoría de EP esporádica donde la causa de la enfermedad estaría definida por la convergencia de factores de riesgo tanto genéticos como ambientales. A pesar de todos los avances conseguidos desde que en 1817 J. Parkinson asentara la base clínica de la EP, aún hay muchas preguntas sin respuesta acerca de los mecanismos implicados en la enfermedad. Entre otras, qué hay en las ND o en su entorno que las hace morir de manera selectiva en la SN o cómo están conectados todos los genes implicados en el origen y desarrollo de esta enfermedad.

Desde el descubrimiento de los miRNAs y su implicación en la neurodegeneración ha habido un gran interés dirigido a determinar si de ellos podría ser empleado como marcador para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la respuesta terapéutica.

Nuestros estudios se centraron en la caracterización de la variación en la región 3'UTR de los genes *SNCA* y *LRRK2* en EP esporádica. El papel de estas regiones no traducidas ha adquirido relevancia tras descubrirse que la unión de miRNAs a esas secuencias condiciona la estabilidad del ARNm y la expresión proteica. Es decir, los cambios en la secuencia génica a ese nivel podrían resultar en diferencias en la estabilidad de los mensajeros y diferencias en la expresión post-traducciona por creación o disrupción de dianas de unión de miRNAs, explicando así la asociación entre los polimorfismos en 3'UTR y la EP. Por otro lado, hemos caracterizado el perfil de expresión o miRnoma del tejido cerebral de pacientes y donantes sanos, y del plasma sanguíneo (miRNAs “circulantes”) de enfermos y controles.

En general, la muestra de pacientes analizada en nuestros estudios de asociación genética tenía unas características similares a las de otros investigadores, con una edad media de inicio de 59 ± 12 años y una relación hombres/mujeres de 1,2 a 1. El 28% eran casos con antecedentes familiares y ninguno tenía mutaciones puntuales o reordenamientos génicos del gen *SNCA*. El 3% del total eran portadores de las mutaciones

p.G2019S y p.R1441G en *LRRK2*, valores que coinciden con los publicados para la población española.

3'UTR de *SNCA*

Variantes polimórficas en el gen *SNCA* se han relacionado con la EP esporádica, con dos bloques de marcadores en DL en la región 5' del gen (promotor) y en la 3'UTR. En la zona 5' el polimorfismo de referencia sería el microsatélite Rep1 (D4S3481) para el que el alelo de 263 pb sería significativamente más frecuente entre los pacientes, teniendo el alelo de 259 pb un efecto protector ^[101-106]. En la región 3' de *SNCA* los SNPs rs356165, rs356219 y rs17016074 se asociaron a mayor riesgo de EP en diferentes poblaciones europeas, y datos de GWAS han puesto de manifiesto la asociación entre rs11931074 y la EP, especialmente en la población asiática ^[50-51, 107-109].

En nuestra cohorte no encontramos asociación con la EP para los haplotipos formados por rs2619364-rs6848726 en la región 5', pero si para las variantes rs356165 y rs11931074 en 3'. El alelo de riesgo rs356165-G está sobrerrepresentado en los EP y además se correlacionó con un inicio más temprano: los homocigotos GG tenían una edad de diagnóstico 4 años menor que los no portadores. El haplotipo de riesgo rs356165-rs11931074 G-T era más frecuente en los EP, con una frecuencia del A-G mayor en los controles. El efecto de rs11931074 se debería a su DL con rs356165 ($D'=0,82$), ya que el haplotipo A-T tiene la misma frecuencia en pacientes y controles. Nos propusimos investigar cuál podría ser el efecto de rs356165 sobre la expresión génica. Sotiriou y cols. hallaron dos transcritos de *SNCA*, uno con una 3'UTR corta de 574 nt y otro con una larga de 1.077 bases. En los tejidos cerebrales analizados el 95% de los ARNm tenían la 3'UTR corta ^[110]. Se ha propuesto que variantes de riesgo en la 3'UTR larga están asociadas con la patología a través de una mayor acumulación y agregación de ARN largos. Además, el efecto de riesgo de rs356165 podría ser a través de la modificación de la respuesta a dopamina de la 3'UTR de *SNCA*, ya que se ha descrito que la dopamina actúa co-

transcripcionalmente modificando la escisión y poliadenilación de la 3'UTR ^[111]. Como rs356165 se encuentra en la 3'UTR larga, nos propusimos investigar si había diferencias en la cantidad de los dos transcritos según los genotipos. Hallamos la forma larga de la 3'UTR en tejidos con los tres genotipos, incluido el genotipo protector.

Se ha sugerido que miR-34-3p podría regular la expresión de *SNCA* uniéndose a la región donde se encuentra rs356165 ^[111]; sin embargo nosotros no encontramos ningún miRNA candidato a regular la expresión en esta región. Otro mecanismo que podría ligar la variación en 3'UTR con la patogenia de la EP serían las diferencias en los niveles de las distintas isoformas de la región codificadora de *SNCA*, que son fundamentalmente 4: *SNCA*-140 (transcrito completo), -126 (carece del exón 3), -112 (carece del exón 5) y -98 (no tiene los exones 3 y 5). Se han descrito diferencias en la formación de fibrillas y agregados entre estas isoformas de *SNCA* ^[112]. Los estudios de cuantificación de los niveles de *SNCA* se han centrado fundamentalmente en el transcrito total, sin determinar los niveles de las isoformas, y los alelos de riesgo del microsatélite Rep1 han sido relacionados con mayores niveles de ARNm mientras que los de riesgo en la región 3' conllevarían menores niveles ^[113-117].

En nuestro estudio hemos determinado el nivel de las isoformas en las muestras de tejido cerebral. Mc Lean y cols. fueron los primeros en cuantificar el transcrito completo y las tres isoformas en tejido cerebral de pacientes con EP ^[118]. Observaron que las diferentes isoformas presentaban una distribución dependiente de región en SN, CB y córtex. Nosotros no apreciamos diferencias en *SNCA*-140 entre las muestras de enfermos y controles en ninguna de las tres regiones cerebrales. Sin embargo, los transcritos *SNCA*-112 y -98 presentaron mayores niveles en el CB de los enfermos y observamos una tendencia similar en la SN, aunque sin diferencias significativas con los controles.

Varios estudios han tratado de correlacionar la expresión de las isoformas con polimorfismos de riesgo en la zona 3' del gen. Un estudio sobre cerebelo de pacientes no encontró relación con el polimorfismo rs356165 ^[119]. McCarthy y cols. hallaron una correlación entre los niveles de *SNCA*-112 en el córtex cerebral de sujetos sanos con los

alelos de riesgo de rs356165, rs356219 y rs2736990 ^[120]. Nuestro estudio sería el primero en determinar los niveles de las isoformas según el genotipo de rs356165 y en una región cerebral directamente afectada por la EP. Los tres genotipos estaban presentes en las muestras de pacientes, y no hallamos diferencias entre los genotipos para las cantidades estimadas de los 4 transcritos de *SNCA*. Aunque este resultado sugiere la ausencia de un efecto del polimorfismo a ese nivel, hay que tener en cuenta que está basado en un tamaño muestral bajo, por lo que habría que validar los resultados en un grupo mayor de tejidos de pacientes y donantes sanos.

3'UTR de *LRRK2*

La EP causada por mutaciones en *LRRK2* suele caracterizarse por una sintomatología similar a la de EP de inicio tardío, aunque hay una gran variabilidad en la edad de inicio y en la neuropatología de los cerebros autopsiados ^[41, 121-122]. De los más de 100 cambios de aminoácido descritos únicamente se consideran patogénicos N1437H, R1441C/G/H, Y1699C, S1761R, I2012T, G2019S y I2020T. Nuestra cohorte de pacientes de Asturias y Navarra tenía una frecuencia de portadores p.R1441G del 1% y p.G2019S de alrededor del 2%, en consonancia con las frecuencias esperadas para la EP esporádica en España. La variante p.M1646T fue descrita recientemente como factor de riesgo en caucásicos, mientras que p.G2385R, p.R1628P y p.A419V son en este orden los principales factores de riesgo en asiáticos ^[53, 123-125]. El haplotipo formado por N551K-R1398H-K1423K se postula como factor protector tanto en caucásicos como asiáticos ^[123]. Estos estudios apoyan la gran confluencia de factores de riesgo genético y ambiental en la EP ligada a cambios en *LRRK2*.

Investigamos la variación genética en la 3'UTR de *LRRK2* y su relación con los niveles del ARNm. De las 12 variantes nucleotídicas identificadas (dos nuevas) el polimorfismo rs66737902 se asoció significativamente al riesgo de EP, con OR=1,37 para el alelo C. Sin embargo, el desequilibrio de ligamiento de este polimorfismo con la variante patogénica p.R1441G ($D'=0,9$) sugiere que parte de su efecto podría deberse al "arrastre"

producido por esta mutación. Dado que este SNP se localiza en una secuencia de unión para el miR-138.2-3p, analizamos en células HEK-293 la regulación por este miRNA de la actividad de un reportero luciferasa conteniendo la región 3'UTR de *LRRK2*. En paralelo, y como control del proceso experimental, confirmamos la regulación de este gen por miR-205 ^[96]. A pesar de que pudimos comprobar que miR-138.2-3p se expresaba en la SN de pacientes y donantes sanos, no hallamos diferencias en la actividad luciferasa entre las células trasfectadas con y sin el miRNA.

En la SN se había cuantificado el ARNm mediante hibridación *in-situ*, observándose una menor señal en pacientes comparados con los controles ^[126]. Sharma y cols. cuantificaron la expresión de *LRRK2* mediante PCR cuantitativa, con menor expresión en varios tejidos de EP y una ausencia de variación regional en los controles; sin embargo, a nivel inmunohistoquímico no encontraron diferencias ^[127]. En nuestras muestras también observamos ausencia de variación en la expresión entre regiones cerebrales en los controles, pero diferencias en los enfermos. Un estudio en fibroblastos, células HEK y córtex cerebral comparó la expresión de *LRRK2* entre portadores p.G2019S y controles, sin hallar diferencias ^[128]. Con el objetivo de investigar la correlación de rs66737902 con la expresión de *LRRK2*, cuantificamos los niveles del ARNm en tejido cerebral de los pacientes y controles sanos. No encontramos diferencias entre los dos grupos para ninguna de las tres regiones cerebrales (SN, CB y CO). Sin embargo, en la SN de los pacientes encontramos menores niveles entre los portadores de alelo de riesgo C. Esto sugiere una relación entre los polimorfismos de riesgo en 3'UTR y los niveles del ARNm de *LRRK2*. Con todo, el número de tejidos utilizado en estos estudios es variable (entre 2 y 15) y la metodología es diferente, lo que podría explicar las discrepancias entre los estudios. Así mismo, nuestros resultados necesitarían ser validados en una corte mayor de tejido de SN tanto de EP como de controles y sería conveniente el análisis de expresión en portadores de mutación en *LRRK2*.

Perfil de expresión de miRNAs en tejido cerebral

Definir el perfil de expresión de miRNAs en las regiones cerebrales implicadas en la EP puede darnos información valiosa acerca de los mecanismos reguladores de la expresión génica implicados en la enfermedad. Algunos estudios han relacionado la infraexpresión de varios miRNAs con el estado patológico, basándose en la comparación entre cerebros de pacientes y de donantes neuropatológicamente sanos. MiR-133b fue el primer micro RNA relacionado con la EP tras observarse una disminución de sus niveles en la SN de EP y en el tejido afectado de un modelo murino de parkinsonismo. Se cree que está relacionado con el mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas [78]. En un perfil de expresión en la amígdala, miR-34b y -34c presentaron una menor expresión en un grupo de pacientes con un estadio temprano de la enfermedad. Estos miRNAs han sido relacionados con la función mitocondrial y el estrés oxidativo, probablemente a través de la regulación de *parkina* y *DJ-1* [84]. A pesar de la subexpresión general que se ha descrito en tejidos de pacientes con EP comparados con los cerebros de donantes sanos, un estudio reciente halló un incremento de los niveles de ciertos miRNAs relacionados con la autofagia mediada por proteínas chaperonas, entre otros miR-21-3p, -224, 373-3p, 26b, 106a, y 301b. Estos miRNAs se postulan como reguladores de la expresión de hsc70 y LAMP-2A [129].

El objetivo de nuestro estudio ha sido caracterizar la expresión de miRNAs en la SN de donantes con EP clínica y neuropatológicamente probada, y compararla con el perfil de donantes sanos. En una primera fase definimos los niveles de expresión de unos 733 miRNAs humanos y hallamos una menor expresión global de estos miRNAs en la SN de los pacientes. A continuación, seleccionamos y cuantificamos en la SN, el cerebelo y el córtex occipital los siguientes siete miRNAs cuya expresión difería significativamente entre los enfermos y controles: miR-369-3p y -450b-3p (sobrerrepresentados en la SN de los enfermos) y miR-136, -337-5p, 508-5p, 548d y 579 (subexpresados en los pacientes). Confirmamos la menor expresión de miR-136 en la SN de los enfermos, y hallamos niveles

mayores en el CB y el CO. Mediante un programa informático (PicTar) determinamos si había procesos fisiológicos en los que el miR-136 podría estar implicado, así como los posibles genes diana susceptibles de ser regulados por éste miRNA. Entre los genes que podrían ser regulados por miR-136 se halla PPARGC1A (cuya relación con la EP ya se discutió previamente), el factor de transcripción Elk1 (que se une a ERK-2 y MAP kinasa que pueden unirse a su vez a la α -synucleína)^[130], y UBE2G1 (enzima de la ruta ubiquitina-proteasoma, relacionada con la EP). También determinamos los niveles de algunos miRNAs previamente relacionados con la EP (miR-133b, -433, o -34b) y que están presentes en los *arrays* de expresión utilizados. Aunque no hay diferencias en los valores de Ct, los niveles de miR-133b y -433 eran menores en los enfermos, aunque las diferencias no alcanzaron la significación.

A pesar de que nuestros resultados sugieren una posible implicación de miR-136 en la EP, los resultados deben tomarse con cautela debido al reducido tamaño muestral (aunque otros estudios publicados se hayan basado en menos muestras). Son necesarios tanto estudios con cohortes mayores y mejor caracterizadas, como estudios funcionales que analicen el efecto de este miRNA sobre la expresión de los genes candidatos a ser regulados por él. Por otro lado, algunos autores han señalado que el intervalo *postmortem* podría condicionar los resultados, y podría explicar las discrepancias entre los estudios^[131-132]. Valoramos si el IPM presente en nuestras muestras (entre 10 y 80 horas) podría estar afectando al perfil de expresión de los miRNAs, pero tras analizar los niveles de los ARNs pequeños que se emplean como controles y de algunos miRNAs que se expresarían constitutiva y uniformemente en los tejidos no hallamos diferencias relevantes entre nuestras muestras. Además, se ha demostrado que los miRNAs son resistentes a la degradación, no observándose diferencias en los niveles entre muestras sometidas a procesos de congelación-descongelación o calentadas a 80°C durante un tiempo^[133]. Por tanto, consideramos poco probable que diferencias en el nivel de degradación entre nuestras muestras pueda condicionar los resultados.

Finalmente, nuestro estudio podría no ser representativo de la desregulación de los miRNAs en estadios tempranos de la enfermedad, ya que los donantes de tejido presentaban una fase avanzada de EP. También, dado que el perfil clínico y patológico difiere entre los portadores de mutaciones en los genes *LRRK2*, *SNCA* y *Parkin* sería importante analizar si hay diferencias en el miRNoma según el gen implicado, o entre estos y pacientes sin mutaciones.

Perfil de expresión de miRNAs en el plasma

El estudio de los niveles de miRNAs en relación a procesos patológicos ha cobrado gran importancia, dado su papel central en la regulación de la expresión génica. Aunque el mecanismo básico de acción tiene que ver con la mayor o menor expresión de los miRNAs en el tejido afectado comparado con el sano, estas moléculas podrían ser importantes como marcadores circulantes en el plasma sanguíneo para el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de la enfermedad.

Algunos miRNAs han sido propuestos como marcadores sanguíneos en varios procesos neurodegenerativos. Por ejemplo, miR-34b se encuentra elevado en el plasma de los enfermos en estadios pre-enfermedad de Huntington; este miRNA se ha relacionado con el envejecimiento (estudios en ratones). Varios miRNAs se han relacionado con la EA, como miR-137, -181c, -9 and -29a ^[134-136]. En cuanto a la EP, varios estudios han buscado algún miRNA circulante que pudiera ser útil en el diagnóstico de la enfermedad. Un estudio en plasmas mostró la asociación de miR-1826/miR-450b-3p, miR-626, y miR-505 con la EP usando diferentes aproximaciones ^[85]. También han sido descritos menores niveles de miR-29c, miR-29a y miR-19b en el suero de pacientes con EP idiopático comparados con sujetos sanos ^[86]. Otro estudio halló miRNAs que podrían diferenciar los pacientes con EP tratados y no tratados, entre ellos miR-1, -22-3p y -29 ^[87].

Como primera aproximación, utilizamos *arrays* TLDA para cuantificar el perfil de expresión plasmática de 360 miRNAs humanos en mezclas (*pools*) de pacientes y

controles. El análisis de *pools* ha sido empleado por otros autores para la identificación de miRNAs candidatos en varias enfermedades, incluido el Alzheimer, la cardiopatía hipertrófica y varios tipos de cáncer ^[137-138].

Por su expresión en las mezclas de enfermos y controles, seleccionamos siete miRNAs que podrían estar sobre o infra-representados en el plasma de los enfermos. Estos candidatos fueron cuantificados individualmente en los 31 pacientes y 25 controles con ensayos específicos para cada miRNA: miR-181c, miR-331-5p, miR-193a-3p, miR-196b, miR-454, miR-125a-3p, and miR-137. Únicamente miR-331-5p mostró diferencia de expresión significativa entre ambos grupos, estando sobrerrepresentado en los pacientes ($p=0,001$). También analizamos el nivel de miR-331-5p en un grupo de pacientes con EA, y hallamos valores similares a los del grupo control y diferentes a los de los casos con EP. Por tanto, este miRNA podría ser útil como marcador sérico para la EP, diferenciando también ésta de la EA.

Llevamos a cabo un análisis bioinformático online (programa DianaLab) para identificar genes candidatos que podrían ser regulados por miR-331-5p, así como posibles rutas fisiológicas a través de las que podría relacionarse con la enfermedad. Identificamos varios genes que están implicados en rutas moleculares relacionadas con el sistema nervioso central y se han relacionado de alguna manera con la EP. Por ejemplo, PPARGC1A/PGC-1 α con el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial y ha sido implicado en la etiología de la EP. Su sobreexpresión reprimiría al factor de transcripción Pitx3 e incrementaría la susceptibilidad a la toxicidad por MPTP ^[139]. En el sistema nigroestriatal de la rata se ha visto que una expresión sostenida de PGC-1 α provoca una disfunción que afecta selectivamente a la función dopaminérgica ^[140]. La sobreexpresión de PARIS (ZNF746, una molécula que interacciona con la parkina) daría lugar a la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la SN; este efecto es revertido por parkina o PGC-1 α ^[141]. La ruta de señalización de TGF- β , en la que hay genes potencialmente regulables por miR-331-5p, se ha relacionado con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y la neuroprotección ^[142]. La expresión de ATF-2 (Activating transcript factor 2) en el cerebro

adulto se ha relacionado con procesos de neurogénesis y neurodegeneración. Este factor, se encuentra infra-expresado en el hipocampo, la SNpc y el núcleo caudado de sujetos con EP, EA y enfermedad de Huntington^[143]. Finalmente, la ruta de síntesis de keratán sulfato ha sido relacionada con el desarrollo del estriado en rata, sugiriendo una relación de los proteoglicanos con este proceso^[144].

Nuestro estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar, el reducido tamaño muestral, por lo que cohortes más grandes de pacientes y controles deberían ser analizadas para confirmar o refutar el papel de miR-331-5p como marcador circulante en la EP. Sería necesario realizar estudios a nivel funcional para clarificar si alguno de los genes candidatos a ser regulados por miR-331-5p lo es realmente. Por otro lado, no sabemos el tejido de origen de este miRNA en el plasma. Idealmente, podría estar sobre-expresado en el cerebro de los pacientes con EP y salir desde ahí a la circulación sanguínea; en tal caso, esto podría explicar los niveles más elevados en los pacientes frente a los controles. Sin embargo, este miRNA no está significativamente sobre-expresado en el tejido cerebral de los pacientes analizados en nuestro estudio. Otra posibilidad a considerar es que proceda de los leucocitos de los pacientes en los que podría estar elevado como consecuencia del “estado inmunológico” o metabólico de los pacientes (por ejemplo, proceso inflamatorio crónico en los pacientes con EP).

Finalmente, las discrepancias entre los estudios publicados sobre la expresión de miRNAs en la sangre se deben principalmente a las diferentes muestras biológicas analizadas (sangre total, plasma, suero), a la diferente metodología aplicada en el cribado de miRNAs (diferentes plataformas, diferentes aproximaciones estadísticas), al empleo de diferentes controles internos para normalizar los niveles de cada miRNA, y a la variabilidad clínica de los pacientes incluidos en los estudios. Claramente, habría que unificar la metodología introduciendo procedimientos que permitieran comparar los resultados de grupos diferentes.

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm
qwertyuiopas **Conclusiones** nmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

CONCLUSIONES

1. El alelo G del polimorfismo rs356165 la región 3'UTR del gen *SNCA* incrementaría el riesgo de desarrollar enfermedad de Parkinson, actuando además como modificador de la edad de inicio.
2. Este polimorfismo no parece afectar a la unión miRNAs conocidos, por lo que sería improbable que un mecanismo mediado por miRNAs explicase la asociación.
3. El polimorfismo rs11931074 en la región 3' del gen *SNCA* se encuentra en desequilibrio de ligamiento con rs356165, ejerciendo el haplotipo G-T un efecto de riesgo y el A-G un efecto protector.
4. No encontramos diferencias en los niveles del transcrito largo *SNCA*-140 entre pacientes y controles para ninguna de las tres regiones cerebrales estudiadas. Sin embargo, los transcritos menores *SNCA*-112 y *SNCA*-98 tendrían niveles menores en el cerebelo y la *sustantia nigra* de los pacientes. Estos niveles no se relacionaron con el polimorfismo rs356165.
5. La región 3'UTR del gen *LRRK2* es muy polimórfica, existiendo una asociación entre el SNP rs66737902 y la EP. Este polimorfismo se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la variante patogénica p. R1441G.
6. Los niveles del transcrito del gen *LRRK2* en la SN de los pacientes se relacionaron con el alelo de riesgo rs66737902-C. La predicción informática indica que este SNP

podría afectar a la unión de miR-128.2-3p. Sin embargo, este efecto no se pudo confirmar mediante ensayos *in vitro*.

7. Observamos una menor expresión general de miRNAs en la SN de los pacientes comparados con donantes sanos. Sólo miR-136 se encontró significativamente infra-expresado en la SN de los enfermos.
8. El análisis del plasma mostró niveles significativamente mayores de miR-331-5p en los pacientes, por lo que este miRNA podría ser un marcador para el diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de los tratamientos frente a la EP. MiR-331-5p se encontraba sobrerrepresentado en los pacientes de EP frente a controles y EA.

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm
qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu

Bibliografia

uiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkinson J., ed. *Essay on the Shaking Palsy*. 1817, London: Sherwood, Neely and Jones.
2. Charcot J.M., ed. *"De la Paralyse Agitante; Leçons sur les Maladies du Système Nerveux"*. (1880b), Paris: Adrien Delahaye. 439–467.
3. Ben-Shlomo Y. (1997). "The epidemiology of Parkinson's disease." Baillieres Clin Neurol 6(1): 55-68.
4. Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O. y cols. (1973). "Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations." J Neurol Sci 20(4): 415-55.
5. Hughes A.J., Daniel S.E. y Lees A.J. (1993). "The clinical features of Parkinson's disease in 100 histologically proven cases." Adv Neurol 60: 595-9.
6. Hughes A.J. (1997). "Clinicopathological aspects of Parkinson's disease." Eur Neurol 38 Suppl 2: 13-20.
7. Calne D.B., Snow B.J. y Lee C. (1992). "Criteria for diagnosing Parkinson's disease." Ann Neurol 32 Suppl: S125-7.
8. Cotzias G.C. (1968). "L-Dopa for Parkinsonism." N Engl J Med 278(11): 630.
9. Youdim M.B., Edmondson D. y Tipton K.F. (2006). "The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors." Nat Rev Neurosci 7(4): 295-309.
10. Carlsson A. (1959). "The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system." Pharmacol Rev 11(2, Part 2): 490-3.
11. Hornykiewicz O. (1966). "Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function." Pharmacol Rev 18(2): 925-64.
12. Bergman H., Wichmann T. y DeLong M.R. (1990). "Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus." Science 249(4975): 1436-8.
13. Forno L.S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." J Neuropathol Exp Neurol 55(3): 259-72.
14. Braak H., Sandmann-Keil D., Gai W. y cols. (1999). "Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry." Neurosci Lett 265(1): 67-9.
15. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M. y cols. (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." Nature 388(6645): 839-40.
16. Braak H., Ghebremedhin E., Rub U. y cols. (2004). "Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology." Cell Tissue Res 318(1): 121-34.

17. Braak H., Del Tredici K., Rub U. y cols. (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." Neurobiol Aging 24(2): 197-211.
18. Braak H., Del Tredici K., Bratzke H. y cols. (2002). "Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages)." J Neurol 249 Suppl 3: III/1-5.
19. Halliday G., Lees A. y Stern M. (2011). "Milestones in Parkinson's disease--clinical and pathologic features." Mov Disord 26(6): 1015-21.
20. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. y cols. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science 276(5321): 2045-7.
21. Trinh J. y Farrer M. (2013). "Advances in the genetics of Parkinson disease." Nat Rev Neurol 9(8): 445-54.
22. Polymeropoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I. y cols. (1996). "Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23." Science 274(5290): 1197-9.
23. Kruger R., Kuhn W., Muller T. y cols. (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." Nat Genet 18(2): 106-8.
24. Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C. y cols. (2004). "The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia." Ann Neurol 55(2): 164-73.
25. Lesage S., Anheim M., Letournel F. y cols. (2013). "G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome." Ann Neurol.
26. Appel-Cresswell S., Vilarino-Guell C., Encarnacion M. y cols. (2013). "Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease." Mov Disord 28(6): 811-3.
27. Proukakis C., Dudzik C.G., Brier T. y cols. (2013). "A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease." Neurology 80(11): 1062-4.
28. Kiely A.P., Asi Y.T., Kara E. y cols. (2013). "alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy?" Acta Neuropathol 125(5): 753-69.
29. Jakes R., Spillantini M.G. y Goedert M. (1994). "Identification of two distinct synucleins from human brain." FEBS Lett 345(1): 27-32.
30. Alves Da Costa C., Paitel E., Vincent B. y cols. (2002). "Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease." J Biol Chem 277(52): 50980-4.
31. Ostrerova N., Petrucelli L., Farrer M. y cols. (1999). "alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins." J Neurosci 19(14): 5782-91.
32. Zimprich A., Biskup S., Leitner P. y cols. (2004). "Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology." Neuron 44(4): 601-7.

33. Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E.W. y cols. (2004). "Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease." Neuron 44(4): 595-600.
34. Bras J.M., Guerreiro R.J., Ribeiro M.H. y cols. (2005). "G2019S dardarin substitution is a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort." Mov Disord 20(12): 1653-5.
35. Correia Guedes L., Ferreira J.J., Rosa M.M. y cols. (2010). "Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: a systematic review." Parkinsonism Relat Disord 16(4): 237-42.
36. Lesage S., Leutenegger A.L., Ibanez P. y cols. (2005). "LRRK2 haplotype analyses in European and North African families with Parkinson disease: a common founder for the G2019S mutation dating from the 13th century." Am J Hum Genet 77(2): 330-2.
37. Ozelius L.J., Senthil G., Saunders-Pullman R. y cols. (2006). "LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews." N Engl J Med 354(4): 424-5.
38. Gonzalez-Fernandez M.C., Lezcano E., Ross O.A. y cols. (2007). "Lrrk2-associated parkinsonism is a major cause of disease in Northern Spain." Parkinsonism Relat Disord 13(8): 509-15.
39. Nuytemans K., Rademakers R., Theuns J. y cols. (2008). "Founder mutation p.R1441C in the leucine-rich repeat kinase 2 gene in Belgian Parkinson's disease patients." Eur J Hum Genet 16(4): 471-9.
40. Kachergus J., Mata I.F., Hulihan M. y cols. (2005). "Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations." Am J Hum Genet 76(4): 672-80.
41. Wider C., Dickson D.W. y Wszolek Z.K. (2010). "Leucine-rich repeat kinase 2 gene-associated disease: redefining genotype-phenotype correlation." Neurodegener Dis 7(1-3): 175-9.
42. Guo L., Gandhi P.N., Wang W. y cols. (2007). "The Parkinson's disease-associated protein, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), is an authentic GTPase that stimulates kinase activity." Exp Cell Res 313(16): 3658-70.
43. James N.G., Digman M.A., Gratton E. y cols. (2012). "Number and brightness analysis of LRRK2 oligomerization in live cells." Biophys J 102(11): L41-3.
44. Taymans J.M., Vancraenenbroeck R., Ollikainen P. y cols. (2011). "LRRK2 kinase activity is dependent on LRRK2 GTP binding capacity but independent of LRRK2 GTP binding." PLoS One 6(8): e23207.
45. Lewis P.A., Greggio E., Beilina A. y cols. (2007). "The R1441C mutation of LRRK2 disrupts GTP hydrolysis." Biochem Biophys Res Commun 357(3): 668-71.
46. Li Y., Dunn L., Greggio E. y cols. (2009). "The R1441C mutation alters the folding properties of the ROC domain of LRRK2." Biochim Biophys Acta 1792(12): 1194-7.

47. Greggio E. y Cookson M.R. (2009). "Leucine-rich repeat kinase 2 mutations and Parkinson's disease: three questions." ASN Neuro 1(1).
48. Liu M., Kang S., Ray S. y cols. (2011). "Kinetic, mechanistic, and structural modeling studies of truncated wild-type leucine-rich repeat kinase 2 and the G2019S mutant." Biochemistry 50(43): 9399-408.
49. Warner T.T. y Schapira A.H. (2003). "Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease." Ann Neurol 53 Suppl 3: S16-23; discussion S23-5.
50. Simon-Sanchez J., Schulte C., Bras J.M. y cols. (2009). "Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease." Nat Genet 41(12): 1308-12.
51. Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta I. y cols. (2009). "Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease." Nat Genet 41(12): 1303-7.
52. Tan E.K., Zhao Y., Skipper L. y cols. (2007). "The LRRK2 Gly2385Arg variant is associated with Parkinson's disease: genetic and functional evidence." Hum Genet 120(6): 857-63.
53. Tan E.K., Peng R., Teo Y.Y. y cols. (2010). "Multiple LRRK2 variants modulate risk of Parkinson disease: a Chinese multicenter study." Hum Mutat 31(5): 561-8.
54. Ross O.A., Wu Y.R., Lee M.C. y cols. (2008). "Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease." Ann Neurol 64(1): 88-92.
55. Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W. y cols. (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science 219(4587): 979-80.
56. Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G. y cols. (2000). "Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease." Nat Neurosci 3(12): 1301-6.
57. Hernan M.A., Takkouche B., Caamano-Isorna F. y cols. (2002). "A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease." Ann Neurol 52(3): 276-84.
58. Quik M. (2004). "Smoking, nicotine and Parkinson's disease." Trends Neurosci 27(9): 561-8.
59. Ross G.W., Abbott R.D., Petrovitch H. y cols. (2000). "Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease." JAMA 283(20): 2674-9.
60. Lee R.C., Feinbaum R.L. y Ambros V. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell 75(5): 843-54.
61. Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G. y cols. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science 294(5543): 858-62.
62. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W. y cols. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science 294(5543): 853-8.
63. Lee R.C. y Ambros V. (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." Science 294(5543): 862-4.

64. Bushati N. y Cohen S.M. (2007). "microRNA functions." Annu Rev Cell Dev Biol 23: 175-205.
65. Bartel D.P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-97.
66. McManus M.T. (2003). "MicroRNAs and cancer." Semin Cancer Biol 13(4): 253-8.
67. Sempere L.F., Cole C.N., McPeck M.A. y cols. (2006). "The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint." J Exp Zool B Mol Dev Evol 306(6): 575-88.
68. Gregory R.I., Yan K.P., Amuthan G. y cols. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature 432(7014): 235-40.
69. Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E. y cols. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science 293(5531): 834-8.
70. Peters L. y Meister G. (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." Mol Cell 26(5): 611-23.
71. Bartel D.P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell 136(2): 215-33.
72. Lewis B.P., Shih I.H., Jones-Rhoades M.W. y cols. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell 115(7): 787-98.
73. Fallar M. y Guo F. (2008). "MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat." Biochim Biophys Acta 1779(11): 663-7.
74. Giraldez A.J., Cinalli R.M., Glasner M.E. y cols. (2005). "MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish." Science 308(5723): 833-8.
75. Schrott G.M., Tuebing F., Nigh E.A. y cols. (2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development." Nature 439(7074): 283-9.
76. Yu J.Y., Chung K.H., Deo M. y cols. (2008). "MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation." Exp Cell Res 314(14): 2618-33.
77. Vo N., Klein M.E., Varlamova O. y cols. (2005). "A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A 102(45): 16426-31.
78. Kim J., Inoue K., Ishii J. y cols. (2007). "A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons." Science 317(5842): 1220-4.
79. Wang G., van der Walt J.M., Mayhew G. y cols. (2008). "Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein." Am J Hum Genet 82(2): 283-9.

80. Wider C., Daxsel J.C., Soto A.I. y cols. (2009). "FGF20 and Parkinson's disease: no evidence of association or pathogenicity via alpha-synuclein expression." Mov Disord 24(3): 455-9.
81. Junn E., Lee K.W., Jeong B.S. y cols. (2009). "Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7." Proc Natl Acad Sci U S A 106(31): 13052-7.
82. Doxakis E. (2010). "Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153." J Biol Chem 285(17): 12726-34.
83. Gehrke S., Imai Y., Sokol N. y cols. (2010). "Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression." Nature 466(7306): 637-41.
84. Minones-Moyano E., Porta S., Escaramis G. y cols. (2011). "MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function." Hum Mol Genet 20(15): 3067-78.
85. Khoo S.K., Petillo D., Kang U.J. y cols. (2012). "Plasma-based circulating MicroRNA biomarkers for Parkinson's disease." J Parkinsons Dis 2(4): 321-31.
86. Botta-Orfila T., Morato X., Compta Y. y cols. (2014). "Identification of blood serum microRNAs associated with idiopathic and LRRK2 Parkinson's disease." J Neurosci Res.
87. Margis R. y Rieder C.R. (2011). "Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease." J Biotechnol 152(3): 96-101.
88. Meister G., Landthaler M., Dorsett Y. y cols. (2004). "Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing." RNA 10(3): 544-50.
89. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H. y cols. (2011). "Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes." Nat Biotechnol 29(4): 341-5.
90. Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R. y cols. (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." Nature 438(7068): 685-9.
91. Ebert M.S., Neilson J.R. y Sharp P.A. (2007). "MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells." Nat Methods 4(9): 721-6.
92. Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L. y cols. (1992). "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases." J Neurol Neurosurg Psychiatry 55(3): 181-4.
93. Miller S.A., Dykes D.D. y Polesky H.F. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res 16(3): 1215.
94. Merril C.R. (1990). "Silver staining of proteins and DNA." Nature 343(6260): 779-80.
95. Betel D., Koppal A., Agius P. y cols. (2010). "Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites." Genome Biol 11(8): R90.
96. Cho H.J., Liu G., Jin S.M. y cols. (2012). "MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein." Hum Mol Genet.

97. Chomczynski P. y Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-9.
98. Livak K.J. y Schmittgen T.D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods 25(4): 402-8.
99. Wang N., Akey J.M., Zhang K. y cols. (2002). "Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation." Am J Hum Genet 71(5): 1227-34.
100. Lorenzo-Betancor O., Samaranch L., Ezquerro M. y cols. (2012). "LRRK2 haplotype-sharing analysis in Parkinson's disease reveals a novel p.S1761R mutation." Mov Disord 27(1): 146-51.
101. Winkler S., Hagenah J., Lincoln S. y cols. (2007). "alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility." Neurology 69(18): 1745-50.
102. Chiba-Falek O. y Nussbaum R.L. (2001). "Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat upstream of the alpha-synuclein gene (SNCA) on transcription in a cell culture luciferase reporter system." Hum Mol Genet 10(26): 3101-9.
103. Maraganore D.M., de Andrade M., Elbaz A. y cols. (2006). "Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease." JAMA 296(6): 661-70.
104. Pals P., Lincoln S., Manning J. y cols. (2004). "alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease." Ann Neurol 56(4): 591-5.
105. Rajput A., Vilarino-Guell C., Rajput M.L. y cols. (2009). "Alpha-synuclein polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Saskatchewan population." Mov Disord 24(16): 2411-4.
106. Hadjigeorgiou G.M., Xiromerisiou G., Gourbali V. y cols. (2006). "Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset." Mov Disord 21(4): 534-9.
107. Myhre R., Toft M., Kachergus J. y cols. (2008). "Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population." Acta Neurol Scand 118(5): 320-7.
108. Mueller J.C., Fuchs J., Hofer A. y cols. (2005). "Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease." Ann Neurol 57(4): 535-41.
109. Mizuta I., Satake W., Nakabayashi Y. y cols. (2006). "Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease." Hum Mol Genet 15(7): 1151-8.
110. Sotiriou S., Gibney G., Baxevanis A.D. y cols. (2009). "A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease." Neurosci Lett 461(2): 196-201.

111. Rhinn H., Qiang L., Yamashita T. y cols. (2012). "Alternative alpha-synuclein transcript usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology." Nat Commun 3: 1084.
112. Bungeroth M., Appenzeller S., Regulin A. y cols. (2014). "Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms." Neurobiol Aging.
113. Chiba-Falek O., Lopez G.J. y Nussbaum R.L. (2006). "Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients." Mov Disord 21(10): 1703-8.
114. Mata I.F., Shi M., Agarwal P. y cols. (2010). "SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level." Arch Neurol 67(11): 1350-6.
115. Fuchs J., Tichopad A., Golub Y. y cols. (2008). "Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain." FASEB J 22(5): 1327-34.
116. Linnertz C., Saucier L., Ge D. y cols. (2009). "Genetic regulation of alpha-synuclein mRNA expression in various human brain tissues." PLoS One 4(10): e7480.
117. Hu Y., Tang B., Guo J. y cols. (2011). "Variant in the 3' region of SNCA associated with Parkinson's disease and serum alpha-synuclein levels." J Neurol.
118. McLean J.R., Hallett P.J., Cooper O. y cols. (2012). "Transcript expression levels of full-length alpha-synuclein and its three alternatively spliced variants in Parkinson's disease brain regions and in a transgenic mouse model of alpha-synuclein overexpression." Mol Cell Neurosci 49(2): 230-9.
119. Westerlund M., Belin A.C., Anvret A. y cols. (2008). "Cerebellar alpha-synuclein levels are decreased in Parkinson's disease and do not correlate with SNCA polymorphisms associated with disease in a Swedish material." FASEB J 22(10): 3509-14.
120. McCarthy J.J., Linnertz C., Saucier L. y cols. (2011). "The effect of SNCA 3' region on the levels of SNCA-112 splicing variant." Neurogenetics 12(1): 59-64.
121. Healy D.G., Falchi M., O'Sullivan S.S. y cols. (2008). "Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study." Lancet Neurol 7(7): 583-90.
122. Santpere G. y Ferrer I. (2009). "LRRK2 and neurodegeneration." Acta Neuropathol 117(3): 227-46.
123. Ross O.A., Soto-Ortolaza A.I., Heckman M.G. y cols. (2011). "Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study." Lancet Neurol 10(10): 898-908.
124. Di Fonzo A., Wu-Chou Y.H., Lu C.S. y cols. (2006). "A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan." Neurogenetics 7(3): 133-8.

125. Farrer M.J., Stone J.T., Lin C.H. y cols. (2007). "Lrrk2 G2385R is an ancestral risk factor for Parkinson's disease in Asia." Parkinsonism Relat Disord 13(2): 89-92.
126. Higashi S., Biskup S., West A.B. y cols. (2007). "Localization of Parkinson's disease-associated LRRK2 in normal and pathological human brain." Brain Res 1155: 208-19.
127. Sharma S., Bandopadhyay R., Lashley T. y cols. (2011). "LRRK2 expression in idiopathic and G2019S positive Parkinson's disease subjects: a morphological and quantitative study." Neuropathol Appl Neurobiol 37(7): 777-90.
128. Devine M.J., Kaganovich A., Ryten M. y cols. (2011). "Pathogenic LRRK2 mutations do not alter gene expression in cell model systems or human brain tissue." PLoS One 6(7): e22489.
129. Alvarez-Erviti L., Seow Y., Schapira A.H. y cols. (2013). "Influence of microRNA deregulation on chaperone-mediated autophagy and alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease." Cell Death Dis 4: e545.
130. Iwata A., Miura S., Kanazawa I. y cols. (2001). "alpha-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1." J Neurochem 77(1): 239-52.
131. Zhang H., Zhang P., Ma K.J. y cols. (2013). "The selection of endogenous genes in human postmortem tissues." Sci Justice 53(2): 115-20.
132. Moreau M.P., Bruse S.E., David-Rus R. y cols. (2011). "Altered microRNA expression profiles in postmortem brain samples from individuals with schizophrenia and bipolar disorder." Biol Psychiatry 69(2): 188-93.
133. Jung M., Schaefer A., Steiner I. y cols. (2010). "Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples." Clin Chem 56(6): 998-1006.
134. Geekiyanage H., Jicha G.A., Nelson P.T. y cols. (2012). "Blood serum miRNA: Non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease." Exp Neurol 235(2): 491-6.
135. Gauthwin P.M., Ciesla M., Lahiri N. y cols. (2011). "Hsa-miR-34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease." Hum Mol Genet 20(11): 2225-37.
136. Li X., Khanna A., Li N. y cols. (2011). "Circulatory miR34a as an RNAbased, noninvasive biomarker for brain aging." Aging (Albany NY) 3(10): 985-1002.
137. Bekris L.M., Lutz F., Montine T.J. y cols. (2013). "MicroRNA in Alzheimer's disease: an exploratory study in brain, cerebrospinal fluid and plasma." Biomarkers 18(5): 455-66.
138. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. y cols. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A 105(30): 10513-8.
139. Clark J., Silvaggi J.M., Kiselak T. y cols. (2012). "Pgc-1alpha overexpression downregulates Pitx3 and increases susceptibility to MPTP toxicity associated with decreased Bdnf." PLoS One 7(11): e48925.

BIBLIOGRAFÍA

140. Ciron C., Lengacher S., Dusonchet J. y cols. (2012). "Sustained expression of PGC-1alpha in the rat nigrostriatal system selectively impairs dopaminergic function." Hum Mol Genet 21(8): 1861-76.
141. Shin J.H., Ko H.S., Kang H. y cols. (2011). "PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease." Cell 144(5): 689-702.
142. Roussa E., von Bohlen und Halbach O. y Kriegelstein K. (2009). "TGF-beta in dopamine neuron development, maintenance and neuroprotection." Adv Exp Med Biol 651: 81-90.
143. Pearson A.G., Curtis M.A., Waldvogel H.J. y cols. (2005). "Activating transcription factor 2 expression in the adult human brain: association with both neurodegeneration and neurogenesis." Neuroscience 133(2): 437-51.
144. Charvet I., Hemming F.J., Feuerstein C. y cols. (1998). "Mosaic distribution of chondroitin and keratan sulphate in the developing rat striatum: possible involvement of proteoglycans in the organization of the nigrostriatal system." Brain Res Dev Brain Res 109(2): 229-44.

qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyuiopasdfghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm
qwertyuiopasdfghjklzxcvbnmqwe
rtyuiopasdfghjklzxcvbnmqwertyu
iopasdfghjklzxcvbnmqwertyuiopa
sdfghjklzxcvbnmqwertyuiopasdfg
hijklzxcvbnmqwertyu **Anexos**ghjkl
zxcvbnmqwertyuiopasdfghjklzxcv
bnmqwertyuiopasdfghjklzxcvbnm

A Search for *SNCA* 3' UTR Variants Identified SNP rs356165 as a Determinant of Disease Risk and Onset Age in Parkinson's Disease

Lucía F. Cardo · Eliecer Coto · Lorena de Mena · René Ribacoba ·
Oswaldo Lorenzo-Betancor · Pau Pastor · LLuis Samaranch · Ignacio F. Mata ·
Marta Díaz · Germán Moris · Manuel Menéndez · Ana I. Corao · Victoria Alvarez

Received: 12 September 2011 / Accepted: 25 October 2011 / Published online: 11 November 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Alpha-synuclein gene (*SNCA*) polymorphisms have been associated with the common sporadic form of Parkinson's disease (PD). We searched for DNA variants at the *SNCA* 3' UTR through single strand conformation analysis and direct sequencing in a cohort of Spanish PD patients and controls. We have genotyped the rs356165 *SNCA* 3' UTR polymorphism in a total of 1,135 PD patients and 772 healthy controls from two Spanish cohorts (Asturias and Navarre). We identified six *SNCA* 3' UTR variants. Single nucleotide polymorphism (SNP) rs356165 was significantly associated with PD risk in the Spanish cohort ($p=0.0001$; odd ratio=1.37, 95%CI=1.19–1.58). This SNP was also significantly associated with early age at onset of PD. Our work highlights rs356165 as an important determinant of the risk of developing PD and early age at onset and encourages future research to identify a functional effect on *SNCA* expression.

Keywords Parkinson's disease · Alpha-synuclein · DNA polymorphisms · Genetic risk

Introduction

Parkinson's disease (PD) (OMIM *168600) is the second most common neurodegenerative disorder affecting 1–2% of people older than 60 years (de Lau and Breteler 2006). Mutations at several genes have been linked to rare familial forms of PD. Most of the PD cases are sporadic, although a family history of the disease is also a well-recognized risk factor for PD (Dickson et al. 2009). Sporadic PD has a multifactorial origin owing to the interaction of genetic/inherited and environmental/acquired risk factors (Warner and Schapira 2003). Rare mutations and genomic rear-

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12031-011-9669-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. F. Cardo · E. Coto · L. de Mena · M. Díaz · A. I. Corao ·
V. Alvarez (✉)
Genética Molecular-Laboratorio de Medicina,
Hospital Universitario Central de Asturias,
33006 Oviedo, Spain
e-mail: victoria.alvarez@sespa.princast.es

R. Ribacoba · G. Moris · M. Menéndez
Neurología, Hospitales Universitario Central Asturias,
and Álvarez Buylla-Mieres,
Asturias, Spain

O. Lorenzo-Betancor · P. Pastor · L. Samaranch
Neurogenetics Laboratory, Division of Neurosciences, Center for
Applied Medical Research, Clínica Universitaria de Navarra,
Pamplona, Spain

E. Coto
Department of Medicine, University of Oviedo,
Oviedo, Spain

O. Lorenzo-Betancor · P. Pastor
Department of Neurology, Clínica Universitaria de Navarra,
Pamplona, Spain

I. F. Mata
Geriatric Research, Education and Clinical Center,
Veterans Affairs Puget Sound Health Care System,
Seattle, WA, USA

I. F. Mata
Department of Neurology,
University of Washington School of Medicine,
Seattle, WA, USA

rangements in the alpha-synuclein gene (*SNCA*) account for approximately 2% of the autosomal dominant familial forms of early-onset PD (Polymeropoulos et al. 1997). *SNCA* encodes a pre-synaptic protein that is the main component of the Lewy bodies, the pathological hallmark of sporadic and many familial PD cases (Spillantini et al. 1997).

SNCA polymorphisms have been associated with sporadic PD through several case–control studies (Mizuta et al. 2006; Mueller et al. 2005; Pals et al. 2004; Yu et al. 2010). Recent genome-wide association studies confirmed the association between some of these single nucleotide polymorphisms (SNPs) with PD, with odd ratios (OR) in the range 1.20–1.70 (Edwards et al. 2010; Satake et al. 2009; Simon-Sanchez et al. 2009). Some of them mapped downstream of the *SNCA* gene and a direct functional effect was thus unlikely. For 3'UTR variants, post-transcriptional regulation of *SNCA* expression through binding of microRNAs (miRNAs) to this region could explain the association to PD (Junn et al. 2009; Doxakis 2010). In this context, the association of some SNPs/haplotypes with PD could be explained by Linkage Disequilibrium (LD) with some functional variants in the 3'UTR. To address this issue, we characterized the *SNCA* 3'UTR variation in a large cohort of PD patients and healthy controls. We found several variants and a significant effect of the SNP rs356165 on PD risk and disease age at onset.

Methods

Patients and Controls

PD patients and healthy controls were Caucasians from two different Spanish regions (Asturias and Navarre). The Asturias cohort consisted of 752 PD patients (mean age at diagnosis 59±13 years; 47% male) and 480 healthy controls (mean age at enrollment 62±18 years; 55% male), and the Navarre cohort consisted of 417 PD patients (mean

age at diagnosis 58±11 years; 62% male) and 292 healthy controls (mean age 63±14 years; 35% male). Table 1 summarizes the main values of these patients and controls. All the patients were recruited in the period January 2002–December 2010 by neurologists from the movement disorder units of five reference hospitals: Central de Asturias, Gijón, Mieres and Avilés (Asturias cohort), and Clínica Universitaria de Navarra (Navarre cohort). PD was diagnosed according to the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical criteria (Hughes et al. 1992). Patients with age at onset <50 or ≥50 years were classified as early-onset (EO) and late-onset (LO) PD, respectively.

The controls were healthy spouses of the patients and healthy donors from the general population. None of the controls presented PD at the age of enrollment. This study was approved by the ethical committee of Hospital Universitario Central de Asturias and the University of Navarra Ethical Committee. All the patients and controls signed an informed consent to participate in the project.

SNCA 3'UTR Analysis

The *SNCA* 3'UTR was amplified in the 727 patients and 480 controls from the Asturias cohort in four overlapping fragments, which were subjected to Single Strand Conformation Analysis (SSCA) to identify nucleotide changes (Supplementary Table 1). Fragments with atypical electrophoresis patterns were sequenced to characterize the nucleotide changes (Supplementary Figure 1).

SNP rs356165 Genotyping

SNP rs356165 was also genotyped through polymerase chain reaction followed by Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) with *TaqI* and electrophoresis in 4% agarose gels to visualize the two alleles (Supplementary Figure 1). To confirm the accuracy of the genotyping method, we sequenced several individuals representative of each genotype as standard samples.

Table 1 Demographics of the Asturias and Navarre cohorts

	Asturias		Navarre		Total	
	PD (<i>N</i> =752)	Controls (<i>N</i> =480)	PD (<i>N</i> =417)	Controls (<i>N</i> =292)	PD (<i>N</i> =1,169)	Controls (<i>N</i> =772)
Mean age (years)	59±13	62±18	58±11	63±14	59±12	64±17
Age range (years)	22–91	18–97	18–84	18–100	18–91	18–100
Male	356 (47%)	263 (55%)	261 (62%)	102 (35%)	648 (56%)	323 (42%)
Early onset (≤50 years)	159 (21%)	–	108 (26%)	–	267 (23%)	–
Family history of PD	218 (29%)	–	114 (27%)	–	332 (28%)	–

PD Parkinson's disease

LRRK2 Mutations

Genomic DNA was obtained from blood and the three common *LRRK2* mutations (R1441G and R1441C in exon 31 and G2019S in exon 41) were determined in all the patients through direct sequencing of PCR fragments, as reported (Mata et al. 2006).

Statistical Analysis

Differences between allelic and genotype frequencies were compared through a Chi-squared test. The Chi-squared test was also used to determine whether the observed genotype frequencies differed from those expected under the Hardy–Weinberg equilibrium. The Student’s *T* test was used to compare the mean age between two groups (risk alleles and risk genotypes between patients and controls or EO vs. LO patients). The effect of each variable (genotype, sex, and age) on PD risk was calculated through multiple logistic regressions. A *p*<0.01 was considered as statistically significant.

Results

SNCA 3’UTR Genetic Variation

To determine whether 3’ UTR variants could be associated with PD, we screened the *SNCA* region in patients and controls from Asturias (Table 1 summarizes the main characteristics of patients and controls). A total of four overlapping fragments were amplified and subjected to SSCA. After sequencing all the heterogeneous electrophoresis patterns, we identified four previously reported SNPs: c.404 C>T (missense for tyrosine136, rs76642636), c.*139 T>G (rs10024743), c.*501 C>T (rs17016074), and c.*893 A>G (rs356165) and two new variants: c.*575_579del (ATTTT deletion) and c.*502 G>A (Supplementary Figure 1).

With the exception of rs356165, the minor allele frequencies were <0.01 (Table 2). Allele rs356165 G was significantly more frequent in the patients group (*p*<0.0001; OR=1.42; 95%CI=1.19–1.69).

Replication of the Association Between rs356165 and PD

SNP rs356165 was initially genotyped through SSCA in the Asturias PD patients and controls. We confirmed the patients and controls genotypes through PCR-RFLP and genotyped an additional cohort from a different population (Navarre). We confirmed the association between this SNP and PD, with a significantly higher frequency of the rs356165 G allele among the patients. Rs356165 AG and GG frequencies were higher among the patients (AA vs. AG + GG *p*<0.0001, OR=1.37, 95%CI=1.19–1.58), suggesting a dominant effect for this allele on PD risk (Table 3). After performing a multiple logistic regression including age at onset, sex, and rs356165 as covariates, this SNP remained significantly associated with PD (*p*<0.0001, OR=1.34, 95%CI=1.09–1.65).

SNP rs356165 is a Modifier of Age at Onset

The disease age at onset was significantly different between rs356165 genotypes, carriers of the rs356165 G allele showed a significantly lower disease age at onset compared to AA homozygote (57.6±12.5 vs. 60.10±12.8; *p*=0.003). This effect can be also observed when comparing the genotype frequencies between the EO and LO groups (Table 4).

We also analyzed the effect of rs356165 on the age at onset in patients with one of the three common *LRRK2* mutations. We found a lower mean age at onset among rs356165 G carriers (53.4±13.2 vs. 58.8±11.7) and a higher frequency of AG + GG among the *LRRK2*+ EO patients (Table 4). However, these were no significant differences maybe because they were based only on 34 patients.

Table 2 DNA variants found in the 3’UTR of *SNCA* in 727 patients and 480 controls from the Asturias cohort, according to the rs356165 genotype

Variant	Patients, N=727			Total	Controls, N=480			Total
	rs356165 AA (n=292)	rs356165 AG (n=338)	rs356165 GG (n=97)		rs356165 AA (n=247)	rs356165 AG (n=188)	rs356165 GG (n=45)	
c. 404 C>T	2 (CT)	1 (CT)	0	3 (CT)	3 (CT)	1 (CT)	0	4 (CT)
c.*139 T>G (rs10024743)	1 (TG)	1 (TG)	0	2 (TG)	0	0	0	0
c.*501 C>T (rs17016074)	0	6 (CT)	4 (CT)	10 (CT)	0	4 (CT)	0	4 (CT)
c.*502 G>A	0	0	0	0	1 (GA)	0	0	1
c.*575_579del	5 (del+/del-)	0	0	5	8 (del+/del-)	0	0	8

Parenthesis indicates the genotypes for the identified variants

Table 3 *SNCA* rs356165 (3'UTR) genotypic and allelic frequencies in patients and controls

	Asturias patients (N=727)	Asturias controls (N=480)	Navarre patients (n=408)	Navarre controls (n=292)	Total patients (n=1,135)	Total controls (n=772)
rs356165						
AA	292 (40%)	247 (52%)	158 (39%)	130 (45%)	450 (40%)	377 (49%)
AG	338 (47%)	188 (39%)	176 (43%)	129 (44%)	514 (45%)	317 (41%)
GG	97 (13%)	45 (9%)	74 (18%)	33 (11%)	171 (15%)	78 (10%)
*A	922 (0.63)	682 (0.71)	492 (0.60)	389 (0.67)	1,414 (0.62)	1,071 (0.69)
*G	532 (0.37)	278 (0.29)	324 (0.40)	195 (0.33)	856 (0.38)	473 (0.31)

*G vs. A: Asturias, $p < 0.0001$; OR=1.42, 95%CI=1.19–1.69; Navarre, $p = 0.016$; OR=1.31, 95%CI=1.05–1.64; Total, $p < 0.0001$; OR=1.37, 95%CI=1.19–1.58

Discussion

SNCA mutations have been linked to familial autosomal dominant PD (A53T, A30P, E46K) (Polymeropoulos et al. 1997; Kruger et al. 1998; Zarranz et al. 2004). In an analysis of 140 patients (37 with a positive family history of PD and 103 sporadic cases), we did not find mutations in the five coding *SNCA* exons (Alvarez et al., unpublished results). In addition to rare mutations, common *SNCA* polymorphisms have been associated with the most common sporadic forms of PD (Edwards et al. 2010; Mizuta et al. 2006; Mueller et al. 2005; Pals et al. 2004; Pastor et al. 2001; Satake et al. 2009; Simon-Sanchez et al. 2009). The mechanism by which these *SNCA* variants lead to PD has not yet been established, although an effect on α -synuclein expression has been proposed for some of them (McCarthy et al. 2011). SNP rs356165 is in the 3'UTR of *SNCA* and has been linked to PD risk among European and Japanese (Mizuta et al. 2006; Mueller et al. 2005; Myhre et al. 2008). This SNP was also associated with the disease in the two Spanish populations included in our study, with the strongest risk among individuals homozygous for the rs356165 G allele and an OR value similar to the one reported by others. Other SNPs in LD with rs356165 have been associated with PD risk. Mata et al. found an association between rs356219 and PD in the populations

here reported (Mata et al. 2011). However, this SNP mapped 3' downstream of *SNCA*, and the association to PD could thus be attributed to LD with rs356165.

Our study also supported a significant effect of this SNP on the age at onset. Homozygous for the G allele had a mean age at onset 4 years lower and were significantly more frequent among patients with early-onset PD (<50 years) compared to homozygous for the A allele. This effect on the age at onset has not been reported by other studies that found a significant association between rs356165 and PD. The G allele was also more frequent among patients with one of the three *LRRK2* mutations and an early age at onset, although the comparison based on a reduced number of patients was not significant results.

A recent study showed a correlation between the rs356165 G allele and the expression of a *SNCA* isoform that lacks exon 5 (SNCA112) and results in a protein prone to aggregation. Frontal cortex of homozygous for the risk G allele showed higher SNCA112 levels compared to AA homozygous. LD between rs356165 and some variants that affected pre-mRNA splicing could explain the association between this 3' UTR SNP and the level of the SNCA112 isoform and its effect on PD risk (McCarthy et al. 2011). Several mechanisms could also explain a direct effect of this SNP on PD risk. First, it could affect mRNA length. *SNCA* contains several polyadenylation sites, and transcripts

Table 4 Rs356165 genotypic and allelic frequencies in early-onset PD (<50 years) and late-onset PD (>50 years), and mean (\pm) onset age in total and *LRRK2*+ patients according to the genotype

	Total EO (N=254)	Total LO (N=881)	Mean age at onset	<i>LRRK2</i> + EO (N=13)	<i>LRRK2</i> + LO (N=21)	Mean age at onset
rs356165						
AA	85 (33%)	365 (41%)	60.1 \pm 12.8	5 (38%)	10 (48%)	58.8 \pm 11.7
AG	122 (48%)	392 (45%)	58 \pm 12.4	7 (54%)	8 (38%)	51.7 \pm 13.4
GG	47 (19%)	124 (14%)	56.6 \pm 12.8	1 (8%)	3 (14%)	58.7 \pm 12.9
A	292 (0.57)	1,122 (0.64)		17 (0.65)	28 (0.66)	
G	216 (0.43)	640 (0.36)		8 (0.35)	14 (0.33)	

EO early-onset PD, LO late-onset PD

with different 3'UTR lengths have been found (Sotiriou et al. 2009). An effect on the length of the *SNCA* transcript was unlikely because this SNP was out of the polyadenylation signals.

The rs356165 could also affect *SNCA* expression through differential binding of miRNAs. MiRNAs are small (approximately 20 nucleotides long) non-coding RNAs that bind to the 3' UTR of mRNAs and regulate expression at post-transcriptional level. Through this process, miRNAs regulate many cellular processes, and the deregulation of miRNA pathways could result in neurodegeneration and PD (Hebert and De Strooper 2007). Some miRNAs have been implicated in the post-transcriptional regulation of *SNCA* (Doxakis 2010). DNA variants at the 3'UTRs could create or destroy miRNA target sites, affecting gene expression. This could explain the association of some 3' UTR polymorphisms to common diseases, including PD (Wang et al. 2008). An *in silico* analysis predicted that rs356165 would not affect the binding of known miRNAs, but *in vitro* studies with reporter plasmids containing the two 3' UTR sequences should be necessary to determine whether this SNP has some effect on mRNA stability. This SNP could have also an effect on RNA editing (the conversion of adenosine to inosine in double-stranded RNA). An online search in the RNA editing database (www.cgen.com/research/Publications) did not find an effect of this SNP on *SNCA* edition. Adenosine deamination on 3'UTR regions could modify the binding of miRNAs (Borchert et al. 2009). Because inosine is chemically and functionally similar to guanosine, the rs356165 would not modify the miRNA-binding profile of the natural A/G variation.

Finally, it is also possible that rs356165 was in LD with some functional variant in the 3' UTR. In addition to this common SNP, we found several 3'UTR rare variants but none of them was predicted to affect the binding of known miRNAs. Furthermore, the minor allele frequencies for these polymorphisms were <0.01, suggesting a limited contribution to PD risk in our population. A limitation of our study was the use of SSCA to the search for DNA variation, an indirect technique with a low rate for false negatives. Thus, we could not exclude that some *SNCA* minor variants were not detected. LD with SNPs at nearby genes could also explain the association between rs356165 and PD. In this regard, *SNCA* is flanked 3' by the multimerin 1 (*MMRNI*) gene and 5' by the G protein-regulated inducer of neurite outgrowth-3 (*GRIN3*) genes. *MMRNI* encodes a factor V/Va binding protein that might function as a carrier protein for platelet factor V, and an effect on PD is unlikely. However, *GRIN3* belongs to a family of proteins that participates in the regulation of synapsis transmission and energy metabolism, two processes that could be impaired in PD.

In conclusion, we confirmed the association between the common *SNCA* rs356165 SNP and PD in two independent populations. We also provided evidence for a significant effect of this SNP on the age at onset. The absence of other 3'UTR variants with PD relevance in our population suggests that this variant could have a direct role on PD. More functional studies to determine its effect on *SNCA* expression should be of special interest.

Acknowledgments Authors thank the “Fundacion Parkinson Asturias” and “Obra Social Cajastur” for their support. This work was supported by grants from the Spanish “Fondo de Investigaciones Sanitarias-Fondos FEDER” European Union (FIS-05/008 and 08/0915). LFC and LDM are predoctoral fellowships of FICYT-Principado de Asturias. LS held a “Torres Quevedo” fellowship from the Spanish Ministry of Science and Technology, co-financed by the European Social Fund. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2006-10126, 2006–2009) by the project 061131 from the “Fundació La Marató de TV3” and by the UTE project FIMA, Spain to PP.

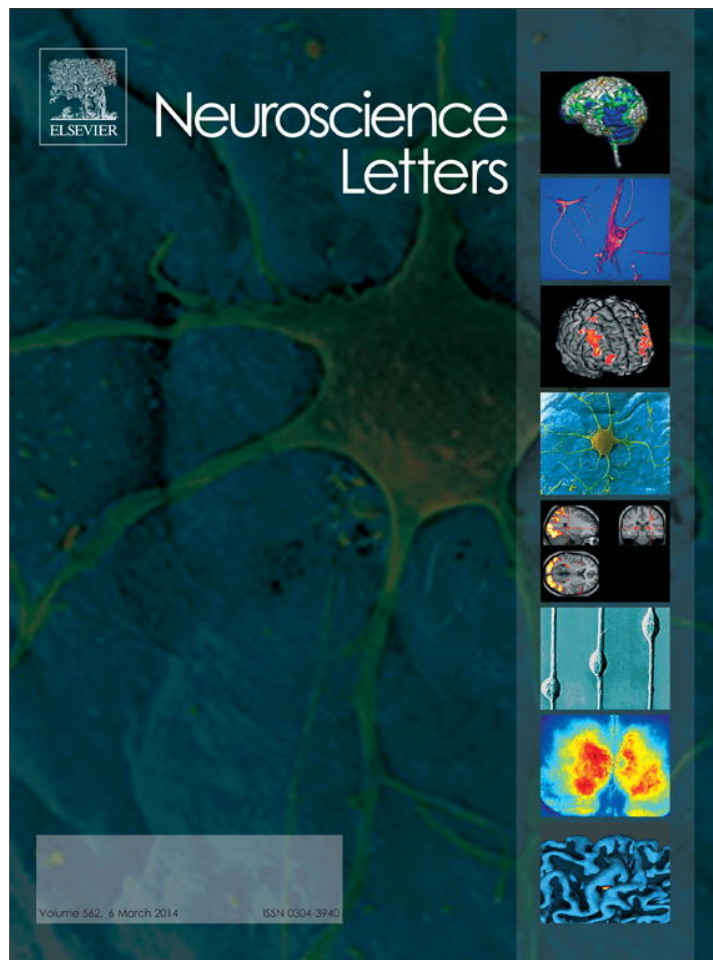
Disclosure The authors report no conflicts of interest.

References

- Borchert GM, Gilmore BL, Spengler RM, Xing Y, Lanier W, Bhattacharya D, Davidson BL (2009) Adenosine deamination in human transcripts generates novel microRNA binding sites. *Hum Mol Genet* 18:4801–4807
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525–535
- Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8:1150–1157
- Doxakis E (2010) Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J Biol Chem* 285:12726–12734
- Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, Wang L, Zuchner S, Konidari I, Wang G, Singer C, Nahab F, Scott B, Stajich JM, Pericak-Vance M, Haines J, Vance JM, Martin ER (2010) Genome-wide association study confirms SNPs in *SNCA* and the *MAPT* region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 74:97–109
- Hebert SS, De Strooper B (2007) Molecular biology. miRNAs in neurodegeneration. *Science* 317:1179–1180
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:181–184
- Junn E, Lee KW, Jeong BS, Chan TW, Im JY, Mouradian MM (2009) Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13052–13057
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106–108
- Mata IF, Ross OA, Kachergus J, Huerta C, Ribacoba R, Moris G et al (2006) LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur J Neurol* 13:391–394
- Mata IF, Yearout D, Alvarez V, Coto E, de Mena L, Ribacoba R, Lorenzo-Betancor O, Samaranch L, Pastor P, Cervantes S, Infante J, Garcia-Gorostiga I, Sierra M, Combarros O, Snapinn

- KW, Edwards KL, Zabetian CP (2011) Replication of MAPT and SNCA, but not PARK16–18, as susceptibility genes for parkinson's disease. *Mov Disord* 5:819–823
- McCarthy JJ, Linnertz C, Saucier L, Burke JR, Hulette CM, Welsh-Bohmer KA, Chiba-Falek O (2011) The effect of SNCA 3' region on the levels of SNCA-112 splicing variant. *Neurogenetics* 12:59–64
- Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T (2006) Multiple candidate gene analysis identifies alpha-synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15:1151–1158
- Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T, Berg D, Wullner U, Meitinger T, Gasser T (2005) Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 57:535–541
- Myhre R, Toft M, Kachergus J, Hulihan MM, Aasly JO, Klungland H, Farrer MJ (2008) Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta Neurol Scand* 118:320–327
- Pals P, Lincoln S, Manning J, Heckman M, Skipper L, Hulihan M, Van den Broeck M, De Pooter T, Cras P, Crook J, Van Broeckhoven C, Farrer MJ (2004) Alpha-synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56:591–595
- Pastor P, Munoz E, Ezquerro M, Obach V, Marti MJ, Valldeoriola F, Tolosa E, Oliva R (2001) Analysis of the coding and the 5' flanking regions of the alpha-synuclein gene in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 16:1115–1119
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045–2047
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41:1303–1307
- Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Kruger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozzi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41:1308–1312
- Sotiriou S, Gibney G, Baxevas AD, Nussbaum RL (2009) A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci Lett* 461:196–201
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839–840
- Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Zuchner S, Scott WK, Martin ER, Vance JM (2008) Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 82:283–289
- Warner TT, Schapira AH (2003) Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53(Suppl 3):S16–S23, discussion S23–15
- Yu L, Xu P, He X, Hu F, Lin Z, Zhu M, Liu Z, He L, Xu Y (2010) SNP rs7684318 of the α -synuclein gene is associated with Parkinson's disease in the Han Chinese population. *Brain Res* 1346:262–265
- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG (2004) The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55:164–173

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Alpha-synuclein transcript isoforms in three different brain regions from Parkinson's disease and healthy subjects in relation to the SNCA rs356165/rs11931074 polymorphisms



Lucía F. Cardo^a, Eliecer Coto^a, Lorena de Mena^a, René Ribacoba^b, Ignacio F. Mata^{c,d}, Manuel Menéndez^b, Germán Moris^b, Victoria Alvarez^{a,*}

^a Genética Molecular-Laboratorio de Medicina, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

^b Neurología, Hospital Universitario Central Asturias and Álvarez Buylla-Mieres, Asturias, Spain

^c Geriatric Research, Education and Clinical Center, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, WA, USA

^d Department of Neurology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA

HIGHLIGHTS

- We determined the association of rs356165–rs11931074 and PD-risk in a Spanish cohort.
- We measured the RNA levels of the four SNCA isoforms in *postmortem* brain tissues.
- We did not find a correlation of genotype with isoforms level.
- We found a tendency of higher levels of the three short SNCA isoforms in the SN of PD brains.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2013

Received in revised form

31 December 2013

Accepted 5 January 2014

Keywords:

Parkinson's disease

Alpha-synuclein isoforms

DNA polymorphisms

Genetic risk

ABSTRACT

Mutations in the alpha-synuclein (SNCA) gene cause autosomal dominant Parkinson's disease (PD). Common SNCA polymorphisms have been associated with the risk of developing PD. Abnormal expression and post-translational modification of SNCA has been found in PD-brains. In addition to a full length transcript (SNCA-140) there are three short isoforms (SNCA-98, -112, and -126) that could be prone to aggregation. The association between SNCA polymorphisms and PD could be explained through an increased expression of these alternative transcripts. Our aim was to measure the different SNCA transcripts in the *substantia nigra* (SN), cerebellum (CB), and occipital cortex (OC) from PD-patients ($n=9$) and healthy subjects ($n=6$). In addition, we determined whether two SNCA polymorphisms (SNPs rs356165 and rs11931074) were related to differences in transcript isoform expression. PD brain tissues showed higher levels of the three short transcripts in the SN, but only SNCA-112 and SNCA-98 were significantly increased in the CB of patients vs. controls ($p=0.02$, $p=0.03$). The genotyping of a large cohort of PD-patients and controls showed that haplotype rs356165-A + rs11931074-G had a protective effect (OR=0.71; CI=0.59–0.83), while the G-T haplotype increased the risk for PD (OR=1.44; CI=1.06–1.96). We did not find significant differences for the SNCA levels between the haplotypes. In conclusion, we found statistically significant higher levels of the SNCA-112 and SNCA-98 transcripts in the CB of PD brains, and a trend toward higher levels of the short transcript isoforms in the SN of PD brains.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD, OMIM 168600) is the second most common neurodegenerative disorder, affecting 1–2% of people >60 years-old. The loss of dopaminergic neurons in the brain *substantia nigra* (SN) is the neuropathological hallmark of PD. Mutations in

the α -synuclein gene (SNCA, PARK1/4 loci, OMIM 163890) cause rare familial forms of autosomal dominant PD [1]. SNCA mutations would result in the abnormal expression and the formation of intracellular protein aggregates in the Lewy bodies (LBs). These α -synuclein aggregates are found in the SN *pars compacta* and other brain regions (such as the *locus coeruleus*) of PD-patients.

Most of the PD cases are sporadic or belong to families without a clear mendelian inheritance. Common SNCA polymorphisms have been associated with the risk of developing PD in these apparently sporadic cases. In particular, single nucleotide polymorphisms (SNPs) that map in the 3' untranslated region (UTR) and

* Corresponding author at: Genética Molecular, Hospital Central Asturias-Maternidad, 33006 Oviedo, Spain. Tel.: +34 985 10 79 68; fax: +34 985 10 79 68.

E-mail address: victoria.alvarez@sespa.princast.es (V. Alvarez).

3' downstream of the *SNCA* gene have been linked to the risk of developing PD by several case–control studies, including large scale genome wide association scans (GWAs) [2–5].

In reference to the *SNCA*-mRNA levels in different brain regions of PD-patients, while some studies reported high levels in the SN others did not find significant differences or found decreased levels in the affected brain regions [6–9]. It has been proposed that the association between the 3' *SNCA* polymorphisms and PD could be explained through an effect on mRNA expression [10–14]. *SNCA* has four major transcripts: *SNCA*-140 (full-length), *SNCA*-126 (lacks exon 3), *SNCA*-112 (lacks exon 5), and *SNCA*-98 (lacks exons 3 and 5) [15]. The three short transcripts could be prone to aggregation, which might result in neurotoxicity [16]. A recent study suggested that a reduction of the *SNCA*-112 and -98 isoforms could rescue dopaminergic neurons from the damaging effect of some neurotoxic agents [17]. In this context, the association between the *SNCA* 3' SNPs and PD-risk could be explained by an effect on the level of these *SNCA* isoforms [11,13,18].

Our aim was to determine the levels of the four *SNCA* transcript isoforms in different regions of *postmortem* brain tissues, and whether there was an association between two common 3' *SNCA* SNPs (rs356165 and rs11931074) and the transcript levels.

2. Materials and methods

2.1. Brain samples and *SNCA* transcript analysis

Tissue specimens from SN ($n=15$), CB ($n=14$) and OC ($n=14$) of nine PD-patients and six healthy donors were kindly provided by the London Neurodegenerative Diseases Brain Bank (LNDBB) (Table 1). All the nine patients showed the criteria for PD diagnosis at *postmortem* examination, including neuronal loss in the SN and the presence of LBs. None of the healthy donors had pathological signals of PD or other neurodegenerative disorder. Total RNA was obtained from 30 mg of each brain tissue specimen (Nucleospin® RNA, Macherey-Nagel; that allows the extraction of large and small RNAs in two different steps). The RNA concentration and quality was determined with *NanoDrop* and only samples with a 260/280 nm ratio between 1.8 and 2.1 (high RNA quality) were used. The RNA integrity was determined through gel electrophoresis (Suppl. Figure 1).

RNA was reverse transcribed to cDNA using the QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen). The level of each transcript was determined through real-time PCR in an ABI7500 equipment (Life technologies), with the *GAPDH* gene as the endogenous control for quantification. The PCR-primers for each *SNCA* isoform were

previously reported [19] (Suppl. Table 1). Briefly, each cDNA was assayed in duplicate in at least three independent runs using iTaq™ Universal SYBER® Green Supermix (Bio-Rad) and the next PCR-conditions: 95 °C to 30 s followed by 35 cycles of 95 °C to 15 s + 58 °C to 34 s (for *SNCA*-112/98, 40 cycles of 95 °C 15 s + 60 °C 34 s) and a final melting curve step. To check for primers specificity, 5 µl of each reaction were electrophoresed on 2% agarose gels and visualised, and two amplicons of each transcript were also purified and sequenced (Suppl. Figures 2 and 3). The amount of each *SNCA* transcript was calculated as the fold difference $2^{-\Delta\Delta Ct}$, in which $\Delta Ct = Ct_{SNCA transcript} - Ct_{GAPDH}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{controls}$ (mean values).

For the 9 PD-patients we isolated the genomic DNA from 20 mg of brain tissues (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit; Fermentas) and the presence of *SNCA* point mutations (exons 2–5) was determined by sequencing PCR-fragments generated with primers that matched the intron-flanking nucleotides (Suppl. Table 1).

2.2. *SNCA* rs11931074 genotyping

The study cohort consisted of a total of 752 PD-patients and 480 healthy controls from Asturias, all previously genotyped for the rs356165 SNP [2]. The rs11931074 was genotyped using a Real-Time TaqMan assay (assay id. C_3208972_10; Applied Biosystems). To confirm the accuracy of the method, we sequenced several individuals representative of each genotype using BigDye chemistry on automated ABI3130xl equipment.

2.3. Statistical analysis

For each brain sample, transcript expression was determined as the mean value of three measures and the Student's *T* and ANOVA tests were used to compare values between different groups. The Pearson chi-squared test was used to determine whether the genotype frequencies deviated from the Hardy–Weinberg equilibrium in patients and controls, and to compare allele and genotype frequencies between the groups. Haplotype frequencies (rs356165–rs11931074) were calculated with the Haploview 4.2 software. The power of the association study was calculated online. A $p \leq 0.05$ was considered as significant for all the statistical comparisons.

3. Results

The sequencing of exons 2–5 showed that none of the nine patients had *SNCA* point mutations. *SNCA* transcripts were

Table 1
Main characteristics of the brain donors, PD-patients ($n=9$) and healthy controls ($n=6$).

Sample ID	Disease status	Gender	AAD	AAO	PMI	rs356165/rs11931074	Microscopy
A143-00	PD	F	89	NA	54	AG/GG	Neuronal loss and LB in SN
A350-96	PD	F	85	83	9	AA/GG	Neuronal loss and LB in the midbrain. Tangle like ubiquitine + structures
A236-95	PD	M	73	NA	40	GG/GG	Neuronal loss and LB in SN
A040-95	PD	F	80	76	72	AA/GG	Neuronal loss and PB in SN, LB in LC
A391-94	PD	M	59	NA	23	AG/GG	Neuronal loss and LB in SN and LC
A323-94	PD	M	74	68	10	GG/GT	Neuronal loss and LB in the midbrain and pons
A044-94	PD	F	81	76	38	GG/GG	Neuronal loss and LB in SN and LC
A248-93	PD	F	73	62	82	AG/GG	LB, PB in SN
A117-93	PD	F	76	74	47	AG/GG	Neuronal loss, LB and PB in SN and LC
A127-11	CNT	M	73	–	23	AG/GG	Normal
A356-99	CNT	F	67	–	24	AA/GG	Normal
A130-09	CNT	M	54	–	31	AA/GG	Normal
A011-06	CNT	F	82	–	43	AG/GG	Normal
HUCA1	CNT	M	64	–	5	AG/GG	Normal
HUCA2	CNT	M	86	–	5	AA/GG	Normal

PD, Parkinson's disease; CNT, control; AAD, age at death (years); AAO, age at onset (years); PMI, *post-mortem* interval (hours); F, female; M, male; NA, not available; SN, substantia nigra; LB, Lewy bodies; PB, pale bodies; LC, locus coeruleus.

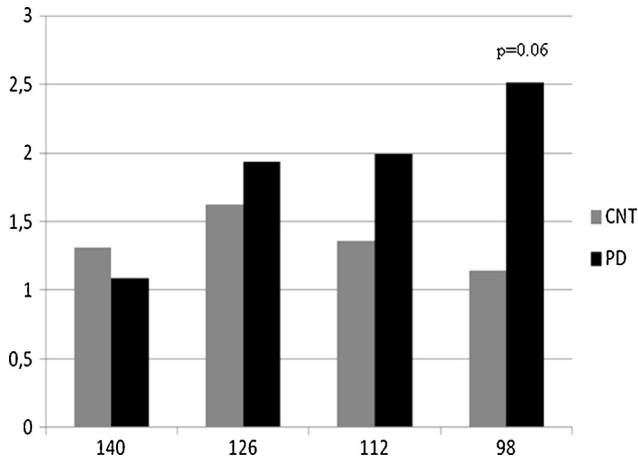


Fig. 1. Mean RQ value of the four *SNCA* isoforms in the SN from healthy subjects (CNT, $n = 6$) and patients (PD, $n = 9$).

measured in the SN from the 9 PD patients and 6 healthy subjects. The four *SNCA* transcripts were amplified from all the 15 SN specimens (Fig. 1). We compared the amount of the full (*SNCA*-140) and the three alternative transcripts between the SN of patients and controls. Compared to controls, patients showed non-significantly higher mean relative values of the three minor isoforms (Fig. 1 and Suppl. Table 2). The analysis of the four isoforms in the CB ($N = 14$) and OC ($N = 14$) regions showed statistical significant differences in the expression of *SNCA*-112 and *SNCA*-98 between the CB of patients and controls ($p = 0.02$ and 0.03 , respectively). The

differences remained statistically significant after correcting by age at death and the *postmortem* interval time.

In order to determine the relationship between PD and the rs356165–rs11931074 a large cohort of patients and controls (previously studied for rs356165) were genotyped for rs11931074. Carriers of rs11931074 T were significantly more frequent among the patients ($p = 0.02$; OR = 1.43, 95% CI = 1.04–1.95). The two SNPs were in strong LD ($D' = 0.85$ in patients, $D' = 0.82$ in controls), with haplotype rs356165 G–rs11931074 T significantly overrepresented in the patients (10% vs. 7%; $p = 0.017$, OR = 1.44 (CI = 1.06–1.96). Haplotype A–G was significantly more frequent among the controls and would thus have a protective effect (62% vs. 70%; $p = 5.86 \times 10^{-5}$, OR = 0.71; CI = 0.59–0.83). This association remained significant after multiple testing with age and gender as covariables. The statistical power of the study (% chance of detecting a difference at a $p < 0.05$ and the patients/controls ratio) was 82 (Suppl. Table 3).

The 15 brain specimens were genotyped for the two SNPs. The three rs356165 genotypes were found among the 9 patients, while 8 patients were rs11931074 GG and only one was heterozygous TG (Table 1). The four *SNCA* transcripts were amplified from all the tissues of patients and controls, without significant RQ values between the genotypes (Fig. 2).

4. Discussion

In addition to a full length transcript, *SNCA* has three alternative short transcripts that are expressed in brain [13,15,19]. These short transcripts might be prone to aggregation in the LB and other intracellular inclusions that characterize PD. McLean et al. reported increased amounts of *SNCA*-140 and *SNCA*-126 in the SN of PD compared to healthy donors [19]. Rhinn et al. studied the level of

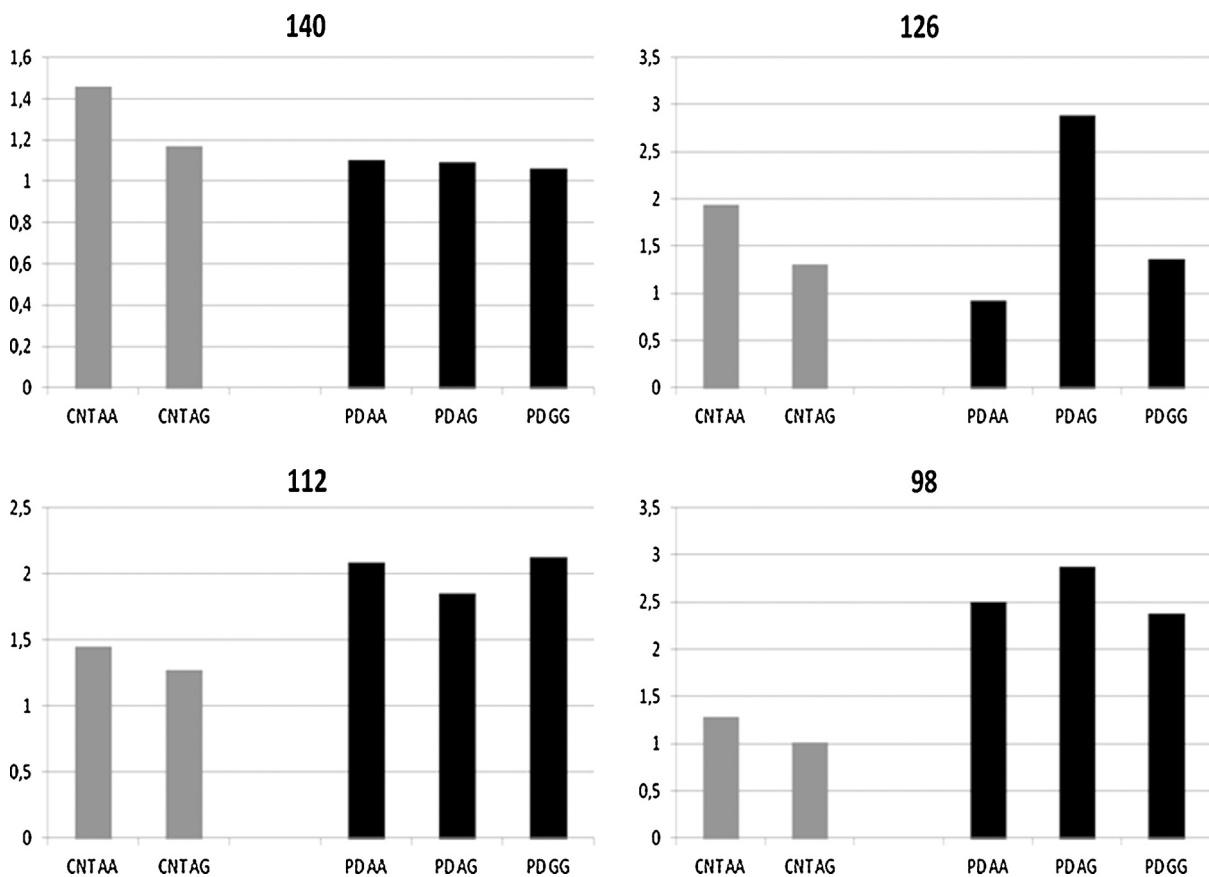


Fig. 2. Mean RQ value of the four *SNCA* isoforms according to the rs356165 genotypes in the SN from healthy subjects (CNT) and Parkinson's disease (PD) brains.

different SNCA 3'UTR isoforms and in addition to a transcript with a long 3'UTR (termed aSynL) they found transcripts with shorter 3'UTRs, with a preponderance of long 3'UTRs (>560 nt) relative to shorter transcripts in the cerebral cortex from PD compared to unaffected subjects [18]. Thus, differences in the expression of alternative SNCA transcripts could contribute to the pathogenesis of PD [8,11]. In agreement with this, we found higher levels of the three short transcripts among the PD compared to healthy subjects tissues.

The SNP rs356165 lies in a LINE element in the 3'UTR of SNCA and was previously associated to the risk of developing PD in our population [2]. Rhinn et al. reported that 3'UTR variants could enhance the accumulation of long transcripts, promoting pathological processes. Among other effects, rs356165 could modify the dopamine responsiveness [18]. We also found a significant effect of rs11931074 on PD-risk, a SNP that mapped 3' downstream of the SNCA gene and was linked to PD through GWAs. The two SNPs were in strong LD, defining a risk haplotype tagged by the rs356165 G allele. The effect of SNCA SNPs on mRNA expression has been investigated by some authors, with conflicting results [8,11]. West-erlund et al. studied CB specimens and found decreased levels of SNCA in PD compared to healthy subjects, but the expression did not correlate with rs356219 [20]. McCarthy et al. studied the effect of three SNCA 3' SNPs (rs356219, rs365165, rs2736990) on SNCA-112 levels in 117 human brain frontal cortex samples from neuropathologically normal donors [13]. This study did not examine SN regions and brain tissue from PD-patients. They found a significantly increased expression of SNCA-112 (relative to total SNCA mRNA) among donors with the risk genotypes. Although the relative amount of this isoform was higher among our patients vs. controls, we did not find significant differences between the rs365165 genotypes.

Our study has several limitations, mainly that the SNCA expression study was based on only 9 patients and 6 healthy donors. This reduced sample size could explain the lack of significance for some of the observed differences. In spite of this limitation, the strength of our study (compared to others) was that we measured the four SNCA alternative transcripts in patients and healthy donors and from three different brain regions in an attempt to correlate the expression levels with the 3' SNPs.

In conclusion, we found statistically significant higher levels of SNCA-112 and SNCA-98 in the CB of PD brains compared to healthy donors. However, although there was trend toward higher levels of the short transcripts in the SN of PD brains the difference was not statistically significant. We think that by increasing the sample size this difference could become significant. We were able to amplify the four SNCA transcript isoforms in all the tissue samples with independency of the donor rs356165 genotype. Although, we did not find significant differences between the genotype groups. However, we cannot rule out that the association between the rs356165 risk-genotype and the level of transcript isoforms might be observed if a large number of samples were analysed.

Authors' contribution

All the authors contributed to this work by recruiting the patients and obtaining the clinical and anthropometric data (R.R., M.M., G.M.), or performing the laboratory work (L.F.C., E.C., I.F.M., and V.A.). All authors have read and approved the submission of this manuscript.

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements

We thank Dr. Claire Troakes and the London Neurodegenerative Diseases Brain Bank for supplying all postmortem brain samples. Authors thank the "Fundacion Parkinson Asturias" and "Obra Social Cajastur" for their support. This work was supported by grants from the Spanish "Fondo de Investigaciones Sanitarias-Fondos FEDER" European Union (FIS 11/0093). LFC and LDM are predoctoral fellowships of FICYT-Principado de Asturias.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.009>.

References

- [1] 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. Athanasiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe, R.L. Nussbaum, Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science* 276 (1997) 2045–2047.
- [2] L.F. Cardo, E. Coto, L. de Mena, R. Ribacoba, O. Lorenzo-Betancor, P. Pastor, L. Samaranch, I.F. Mata, M. Diaz, G. Moris, M. Menendez, A.I. Corao, V. Alvarez, A search for SNCA 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease, *J. Mol. Neurosci.* 47 (2011) 425–430.
- [3] O.A. Ross, D. Gosal, J.T. Stone, S.J. Lincoln, M.G. Heckman, G.B. Irvine, J.A. Johnston, J.M. Gibbon, M.J. Farrer, T. Lynch, Familial genes in sporadic disease: common variants of alpha-synuclein gene associate with Parkinson's disease, *Mech. Ageing Dev.* 128 (2007) 378–382.
- [4] J. Simon-Sanchez, C. Schulte, J.M. Bras, M. Sharma, J.R. Gibbs, D. Berg, C. Paisan-Ruiz, P. Lichtner, S.W. Scholz, D.G. Hernandez, R. Kruger, M. Federoff, C. Klein, A. Goate, J. Perlmutter, M. Bonin, M.A. Nalls, T. Illig, C. Gieger, H. Houlden, M. Steffens, M.S. Okun, B.A. Racette, M.R. Cookson, K.D. Foote, H.H. Fernandez, B.J. Traynor, S. Schreiber, S. Arepalli, R. Zonozzi, K. Gwinn, M. van der Brug, G. Lopez, S.J. Chanock, A. Schatzkin, Y. Park, A. Hollenbeck, J. Gao, X. Huang, N.W. Wood, D. Lorenz, G. Deuschl, H. Chen, O. Riess, J.A. Hardy, A.B. Singleton, T. Gasser, Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease, *Nat. Genet.* 41 (2009) 1308–1312.
- [5] S. Winkler, J. Hagenah, S. Lincoln, M. Heckman, K. Haugarvoll, K. Lohmann-Hedrich, V. Kostic, M. Farrer, C. Klein, alpha-Synuclein and Parkinson disease susceptibility, *Neurology* 69 (2007) 1745–1750.
- [6] K. Beyer, L. Ispierro, P. Latorre, E. Tolosa, A. Ariza, Alpha- and beta-synuclein expression in Parkinson disease with and without dementia, *J. Neurol. Sci.* 310 (2011) 112–117.
- [7] O. Chiba-Falek, G.J. Lopez, R.L. Nussbaum, Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients, *Mov. Disord.* 21 (2006) 1703–1708.
- [8] J. Fuchs, A. Tichopad, Y. Golub, M. Munz, K.J. Schweitzer, B. Wolf, D. Berg, J.C. Mueller, T. Gasser, Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain, *FASEB J.* 22 (2008) 1327–1334.
- [9] A.E. Kingsbury, S.E. Daniel, H. Sangha, S. Eisen, A.J. Lees, O.J. Foster, Alteration in alpha-synuclein mRNA expression in Parkinson's disease, *Mov. Disord.* 19 (2004) 162–170.
- [10] Y. Hu, B. Tang, J. Guo, X. Wu, Q. Sun, C. Shi, L. Hu, C. Wang, L. Wang, L. Tan, L. Shen, X. Yan, H. Zhang, Variant in the 3' region of SNCA associated with Parkinson's disease and serum alpha-synuclein levels, *J. Neurol.* 259 (2011) 497–504.
- [11] C. Linnertz, L. Saucier, D. Ge, K.D. Cronin, J.R. Burke, J.N. Browndyke, C.M. Hulette, K.A. Welsh-Bohmer, O. Chiba-Falek, Genetic regulation of alpha-synuclein mRNA expression in various human brain tissues, *PLoS ONE* 4 (2009) e7480.
- [12] I.F. Mata, M. Shi, P. Agarwal, K.A. Chung, K.L. Edwards, S.A. Factor, D.R. Galasko, C. Ginghina, A. Griffith, D.S. Higgins, D.M. Kay, H. Kim, J.B. Leverenz, J.F. Quinn, J.W. Roberts, A. Samii, K.W. Snapinn, D.W. Tsuang, D. Yearout, J. Zhang, H. Payami, C.P. Zabetian, SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level, *Arch. Neurol.* 67 (2010) 1350–1356.
- [13] J.J. McCarthy, C. Linnertz, L. Saucier, J.R. Burke, C.M. Hulette, K.A. Welsh-Bohmer, O. Chiba-Falek, The effect of SNCA 3' region on the levels of SNCA-112 splicing variant, *Neurogenetics* 12 (2011) 59–64.
- [14] S. Sotiropoulos, G. Gibney, A.D. Baxevanis, R.L. Nussbaum, A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease, *Neurosci. Lett.* 461 (2009) 196–201.
- [15] K. Beyer, M. Domingo-Sabat, J.I. Lao, C. Carrato, I. Ferrer, A. Ariza, Identification and characterization of a new alpha-synuclein isoform and its role in Lewy body diseases, *Neurogenetics* 9 (2008) 15–23.

- [16] K. Beyer, Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers, *Acta Neuropathol.* 112 (2006) 237–251.
- [17] K.L. Ma, L.K. Song, W.A. Long, Y.H. Yuan, Y. Zhang, X.Y. Song, F. Niu, N. Han, N.H. Chen, Deletion in exon 5 of the SNCA gene and exposure to rotenone leads to oligomerization of alpha-synuclein and toxicity to PC12 cells, *Brain Res. Bull.* 90 (2013) 127–131.
- [18] H. Rhinn, L. Qiang, T. Yamashita, D. Rhee, A. Zolin, W. Vanti, A. Abeliovich, Alternative alpha-synuclein transcript usage as a convergent mechanism in Parkinson's disease pathology, *Nat. Commun.* 3 (2012) 1084.
- [19] J.R. McLean, P.J. Hallett, O. Cooper, M. Stanley, O. Isacson, Transcript expression levels of full-length alpha-synuclein and its three alternatively spliced variants in Parkinson's disease brain regions and in a transgenic mouse model of alpha-synuclein overexpression, *Mol. Cell Neurosci.* 49 (2012) 230–239.
- [20] M. Westerlund, A.C. Belin, A. Anvret, A. Hakansson, H. Nissbrandt, C. Lind, O. Sydow, L. Olson, D. Galter, Cerebellar alpha-synuclein levels are decreased in Parkinson's disease and do not correlate with SNCA polymorphisms associated with disease in a Swedish material, *FASEB J.* 22 (2008) 3509–3514.

SHORT COMMUNICATION

The screening of the 3'UTR sequence of *LRRK2* identified an association between the rs66737902 polymorphism and Parkinson's disease

Lucía F Cardo¹, Eliecer Coto^{1,2}, René Ribacoba³, Ignacio F Mata^{4,5}, Germán Moris³, Manuel Menéndez³ and Victoria Alvarez¹

Mutations in the leucine-rich repeat kinase 2 gene (*LRRK2*) are the most common genetic determinants of familial and sporadic Parkinson's disease (PD). Most of the mutational screenings analyzed the exon-coding sequence. Our aim was to determine whether *LRRK2* 3' untranslated region (UTR) variants were associated with the risk of developing PD in a large cohort of patients ($n=743$) and controls ($n=523$) from Spain. We identified a total of 12 3'UTR variants (two new). Single-nucleotide polymorphism (SNP) rs66737902 C allele was overrepresented in patients ($P=0.005$; odds ratio = 1.47). This SNP was in linkage disequilibrium with the p.R1441G mutation, but the association remained significant among mutation-negative cases. We found a significant lower level of the *LRRK2* transcript in the *Substantia nigra* (SN) of PD postmortem donors ($n=9$) who were rs66737902 C carriers ($P=0.01$). This SNP was predicted to affect a binding site for miR-138.2*. We showed that this microRNA was expressed in all the SN samples. In conclusion, we found a significant association between SNP rs66737902 and the risk of developing PD. This effect on PD risk could be explained by differences in *LRRK2* transcript levels between the two alleles.

Journal of Human Genetics (2014) 0, 000–000. doi:10.1038/jhgc.2014.26

Keywords: DNA polymorphisms; genetic risk; *LRRK2* gene; microRNAs; Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) affects 1–2% of people older than 60 years.¹ In addition to rare mutations that have been linked to familial forms of PD, DNA polymorphisms at several genes could contribute to the risk of developing sporadic PD. The leucine-rich repeat kinase 2 gene (*LRRK2*, *PARK8*) has been linked to both sporadic and familial PD.^{2–5} The *LRRK2* p.G2019S accounts for 30–40% of PD cases among North African Berbers patients and Ashkenazi Jews and has also been found in 5% of Spanish patients.⁶ The p.R1441G mutation is also common in Spain, with a frequency in PD cases close to 8% in some regions.⁷ The *LRRK2* gene encodes a protein with multiple functional domains, including leucine-rich repeats, a GTPase domain and a kinase domain, which, in addition to the brain, is expressed in multiple tissues.⁸ The mutations found in PD patients disrupt the enzymatic activities of the protein by affecting the kinase (p.G2019S) or the GTPase (p.R1441G/C) activities.^{9,10} Some studies also reported differences in *LRRK2* between the brains from PD cases compared with those from controls.^{11–13}

Most of the mutational screenings were focused on the *LRRK2* coding exons, whereas little is known about the contribution of 3'UTR variants to the risk for PD. However, several studies have

provided strong evidence of the role of this gene region on the regulation of *LRRK2* expression through microRNA binding, and the control of cellular pathways in which this gene is implicated. Among others, pathogenic *LRRK2* antagonizes let-7 and miR-184* in *Drosophila*, leading to the overproduction of proteins implicated in cell cycle regulation and survival.¹⁴ It was also reported that miR-205 is able to suppress the expression of *LRRK2* by targeting a conserved binding site in the 3'UTR region.¹⁵ Our first aim was to characterize the contribution of the *LRRK2* 3'UTR variation in the development of PD.

The study involved a total of 743 PD patients and 523 healthy controls, all Iberians from the region of Asturias (Northern Spain). The main characteristics of these cohorts are summarized in Table 1 and were previously reported.¹⁶ The *LRRK2* 3'UTR was amplified in six overlapping fragments (Supplementary Table 1), which were subjected to single strand conformation analysis and direct sequencing to identify the nucleotide changes. We found a total of 12 variants (Supplementary Table 2), and only the SNP rs66737902 was linked to the risk of developing PD: allele C-carriers were frequent among the patients ($P=0.005$; odds ratio = 1.47, 95% confidence

¹Genética Molecular-Laboratorio de Medicina, Hospital Universitario Central de Asturias-Maternidad, Oviedo, Spain; ²Department of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain; ³Neurología, Hospitales Universitario Central Asturias and Álvarez Buylla-Mieres, Asturias, Spain; ⁴Geriatric Research, Education and Clinical Center, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, WA, USA and ⁵Department of Neurology, University of Washington School of Medicine, Seattle, WA, USA
Correspondence: Dr V Alvarez, Genética Molecular-Laboratorio de Medicina, Hospital Universitario Central de Asturias-Maternidad, 33006 Oviedo, Spain.
E-mail: victoria.alvarez@sespa.princast.es

Received 20 February 2014; revised 14 March 2014; accepted 24 March 2014

Q1

Q2

Q10

Table 1 Main characteristics of patients and controls enrolled in the study

	Patients (N = 743)	Controls (N = 523)
Mean age, years	67 ± 10	67 ± 12
Mean onset age, years	60 ± 12	—
Male	389 (52%)	261 (50%)
Early onset PD (≤50 years)	129 (17%)	—
Family history of PD	208 (28%)	—
<i>LRRK2</i>		
p.G2019S	16 (2%)	—
p.R1441G	15 (2%)	—

Abbreviations: *LRRK2*, leucine-rich repeat kinase 2 gene; PD, Parkinson's disease.

Table 2 Genotype and allele frequencies of the four 3'UTR SNPs in PD patients and controls, and frequencies in the 1000 Caucasian genomes (www.ensembl.org)

	Patients (N = 743)	Controls (N = 523)	1000 genomes EUR
<i>rs66737902</i> ^a			
TT	543 (73%)	418 (80%)	77%
TC	183 (25%)	94 (18%)	20%
CC	17 (2%)	11 (2%)	3%
T	1269 (0.85)	930 (0.89)	0.87
C	217 (0.15)	116 (0.11)	0.13
<i>rs10878441</i>			
AA	89 (12%)	63 (12%)	11%
AC	347 (47%)	260 (50%)	41%
CC	307 (41%)	200 (38%)	48%
A	525 (0.35)	282 (0.38)	0.32
C	961 (0.65)	452 (0.62)	0.68
<i>rs3886747</i>			
CC	89 (12%)	63 (12%)	11%
CT	347 (47%)	260 (50%)	41%
TT	307 (41%)	200 (38%)	48%
C	525 (0.35)	282 (0.38)	0.32
T	961 (0.65)	452 (0.62)	0.68
<i>rs1365770</i>			
GG	77 (10%)	42 (8%)	11%
GC	345 (47%)	251 (48%)	41%
CC	321 (43%)	230 (44%)	48%
G	499 (0.34)	335 (0.32)	0.32
C	987 (0.66)	711 (0.68)	0.68

Genotype frequencies did not deviate from the expected according to the Hardy-Weinberg equilibrium in both patients and controls.

^aPatients vs controls, TC + CC vs TT: $P = 0.005$, odds ratio = 1.47, 95% CI = 1.12–1.92 ($P = 0.02$, odds ratio = 1.37, CI = 1.04–1.80 after excluding the 31 *LRRK2* mutation carriers).

interval (CI) = 1.12–1.92) (Table 2). The sample size was enough for a power > 80. The difference remained significant after correcting for age and gender ($P = 0.01$; odds ratio = 1.47, 95% CI = 1.09–1.97). To our knowledge, the association between PD and rs66737902 has not been reported by others who also examined the *LRRK2* 3'UTR.^{4,17} This SNP showed a heterogeneous worldwide frequency distribution, but was absent among the Chinese and Japanese (www.ensembl.org). Differences in ethnic background could thus explain these discrepancies.

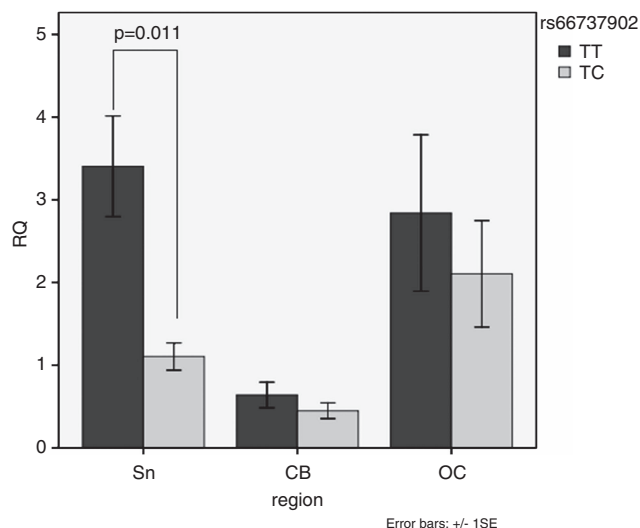


Figure 1 Mean *LRRK2* expression (cDNA) in the SN, cerebellum (CB) and occipital cortex (OC) of the nine PD donors according to the rs66737902 genotype (4 TC, 5 TT). The level of *LRRK2* mRNA was determined through real-time PCR using ABI7500 equipment (Life Technologies) and the *GAPDH* gene was used as the endogenous control for quantification. Each cDNA was amplified in triplicate using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) under the following PCR conditions: 95°C for 30s followed by 40 cycles at 95°C for 15s and at 58°C for 34s, and a final melting curve stage. The amount of *LRRK2* was calculated as the fold difference $2^{-\Delta\Delta Ct}$, in which $\Delta Ct = Ct \text{ LRRK2} - Ct \text{ GAPDH}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ controls mean}$. *LRRK2* primers: ATA TAA AGG CTC GCG CTT CT and TGG CAT TCA CAA AGT GGT AAT (amplified fragment = 162 bp). *GAPDH* primers: GGA AGG ACT CAT GAC CAC AG and TTG GCA GGT TTT TCT AGA CGT (amplified fragment = 249 bp).

We found significant linkage disequilibrium between rs66737902 and the p.R1441G (rs33939927): a total of 15 patients were heterozygous for this mutation, and 14 and 1 were rs66737902 TC and TT, respectively. This mutation was not found among the 105 controls who were rs66737902 C carriers. After excluding the 15 p.R1441G mutation carriers, carriers of rs66737902 C remained significantly increased among the patients. This suggested that the risk effect of this 3'UTR allele could not be fully explained by its linkage disequilibrium with the *LRRK2* mutation. In contrast, most of the p.2019S mutation (13/16) cases were homozygous for the rs66737902 TT protective genotype.

We measured the *LRRK2* cDNA levels in three brain regions (SN, cerebellum, and the occipital cortex) of 9 PD donors kindly provided by the London Neurodegenerative Diseases Brain Bank (Supplementary Table 3). Tissue processing and expression assays were performed as reported by Cardo *et al.*¹⁶ Briefly, the level of *LRRK2* and *GAPDH* (constitutively expressed normalization control) cDNAs was determined using SYBR Green. The amount of *LRRK2* was calculated as the fold difference, $2^{-\Delta\Delta Ct}$. We found a significant mean lower level of *LRRK2* cDNA ($P = 0.01$) in the SN of rs66737902 TC ($n = 4$) vs TT ($n = 5$) donors (Figure 1). This effect was not seen in the cerebellum and cortex samples. Some studies have found significant reductions of *LRRK2* mRNA in the brains from PD cases compared with controls.¹¹ In the brains of patients with PD, *LRRK2* immunoreactivity was reduced in SN neurons, a fact that reflects the disease-associated loss of dopaminergic neurons in this brain region.¹² Another study did not find significant alteration in *LRRK2* expression between brain tissue from p.G2019S mutation carriers and those from controls.¹³ None of the nine brain donors analyzed was a p.R1441G

carrier, and thus we could not examine whether this mutation was also linked to differences in *LRRK2* expression. The differences in mRNA expression between the genotypes could be attributed to its linkage disequilibrium with p.R1441G, but whether they also exist at the protein level can be confirmed only through additional studies.

Finally, an online analysis with two miRNA-site prediction software programs identified miR-138.2 as a candidate that could bind to the rs66737902 T sequence (Supplementary Figure 1). We found that this miRNA was expressed in all the nine SN samples (Supplementary Figure 2). Thus, the PD-protective T allele could result in enhanced miRNA binding and the downregulation of the *LRRK2* mRNA. However, this would be in opposition to the higher transcript levels among the TT SN samples. Moreover, this binding site was recognized by only one of the programs and with a low score (Supplementary Figure 1). Although we considered unlikely a direct effect of the rs66737902 SNP through different binding of miR-138.2 to the two alleles, *in vitro* studies with neural cells transfected with reporter vectors coupled to 3'UTRs with the two alleles are required in case other studies confirm the genetic association.

In conclusion, we report the association between the *LRRK2* rs66737902 SNP and PD. This effect could be mediated by a significant reduction of gene expression in the SN of individuals with the risk allele, and require validation in other populations, with larger samples of brain tissues.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Claire Troakes and the London Neurodegenerative Diseases Brain Bank for supplying all post mortem brain samples. We also thank the 'Fundacion Parkinson Asturias' and 'Obra Social Cajastur' for their support. This work was supported by grants from the Spanish 'Fondo de Investigaciones Sanitarias-Fondos FEDER' European Union (FIS 11/0093). LFC is a predoctoral fellowship from FICYT-Principado de Asturias.

Author contributions: All the authors contributed to this work by recruiting the patients and obtaining the clinical and anthropometric data or by performing the laboratory work. All authors have read and approved the submission of this manuscript.

- 1 de Lau, L. M. & Breteler, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **5**, 525–535 (2006).
- 2 Paisan-Ruiz, C., Jain, S., Evans, E. W., Gilks, W. P., Simon, J., van der Brug, M. *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause *PARK8*-linked Parkinson's disease. *Neuron* **44**, 595–600 (2004).
- 3 Healy, D. G., Falchi, M., O'Sullivan, S. S., Bonifati, V., Durr, A., Bressman, S. *et al.* Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of *LRRK2*-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* **7**, 583–590 (2008).
- 4 Rubio, J. P., Topp, S., Warren, L., St Jean, P. L., Wegmann, D., Kessner, D. *et al.* Deep sequencing of the *LRRK2* gene in 14,002 individuals reveals evidence of purifying selection and independent origin of the p.Arg1628Pro mutation in Europe. *Hum. Mutat.* **33**, 1087–1098 (2012).
- 5 Seki, N., Takahashi, Y., Tomiyama, H., Rogaeva, E., Murayama, S., Mizuno, Y. *et al.* Comprehensive mutational analysis of *LRRK2* reveals variants supporting association with autosomal dominant Parkinson's disease. *J. Hum. Genet.* **56**, 671–675 (2011).
- 6 Correia Guedes, L., Ferreira, J. J., Rosa, M. M., Coelho, M., Bonifati, V. & Sampaio, C. Worldwide frequency of G2019S *LRRK2* mutation in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat. Disord.* **16**, 237–242 (2010).
- 7 Gonzalez-Fernandez, M. C., Lezcano, E., Ross, O. A., Gomez-Esteban, J. C., Gomez-Busto, F., Velasco, F. *et al.* *Lrrk2*-associated parkinsonism is a major cause of disease in Northern Spain. *Parkinsonism Relat. Disord.* **13**, 509–515 (2007).
- 8 Cookson, M. R. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 791–797 (2010).
- 9 West, A. B., Moore, D. J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W. W., Ross, C. A. *et al.* Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 16842–16847 (2005).
- 10 Lewis, P. A., Greggio, E., Beilina, A., Jain, S., Baker, A. & Cookson, M. R. The R1441C mutation of *LRRK2* disrupts GTP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 668–671 (2007).
- 11 Sharma, S., Bandopadhyay, R., Lashley, T., Renton, A. E., Kingsbury, A. E., Kumaran, R. *et al.* *LRRK2* expression in idiopathic and G2019S positive Parkinson's disease subjects: a morphological and quantitative study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **37**, 777–790 (2011).
- 12 Higashi, S., Biskup, S., West, A. B., Trinkaus, D., Dawson, V. L., Faull, R. L. *et al.* Localization of Parkinson's disease-associated *LRRK2* in normal and pathological human brain. *Brain Res.* **1155**, 208–219 (2007).
- 13 Devine, M. J., Kaganovich, A., Ryten, M., Mamais, A., Trabzuni, D., Manzoni, C. *et al.* Pathogenic *LRRK2* mutations do not alter gene expression in cell model systems or human brain tissue. *PLoS One* **6**, e22489 (2011).
- 14 Gehrke, S., Imai, Y., Sokol, N. & Lu, B. Pathogenic *LRRK2* negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* **466**, 637–641 (2010).
- 15 Cho, H. J., Liu, G., Jin, S. M., Parisiadou, L., Xie, C., Yu, J. *et al.* MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 608–620 (2012).
- 16 Cardo, L. F., Coto, E., de Mena, L., Ribacoba, R., Mata, I. F., Menendez, M. *et al.* Alpha-synuclein transcript isoforms in three different brain regions from Parkinson's disease and healthy subjects in relation to the SNCA rs356165/rs11931074 polymorphisms. *Neurosci. Lett.* **562**, 45–49 (2014).
- 17 Wu-Chou, Y. H., Chen, Y. T., Yeh, T. H., Chang, H. C., Weng, Y. H., Lai, S. C. *et al.* Genetic variants of SNCA and *LRRK2* genes are associated with sporadic PD susceptibility: a replication study in a Taiwanese cohort. *Parkinsonism Relat. Disord.* **19**, 251–255 (2013).

Supplementary Information accompanies the paper on Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/jhg>)

Profile of microRNAs in the plasma of Parkinson's disease patients and healthy controls

Lucía F. Cardo · Eliecer Coto · Lorena de Mena ·
Renée Ribacoba · Germán Moris · Manuel Menéndez ·
Victoria Alvarez

Received: 13 February 2013 / Revised: 18 March 2013 / Accepted: 19 March 2013 / Published online: 30 March 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Dear Sirs,

The pathological hallmark of Parkinson's disease (PD) is the loss of dopaminergic neurons and the presence of Lewy bodies and Lewy neurites in the *substantia nigra pars compacta*, corpus striatum and brain cortex [1]. PD is a complex disease caused by the interaction of genetic/inherited and environmental/acquired risk factors [2]. MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that control gene expression by binding to the 3' UTRs of mRNAs [3]. Post-mortem analysis of brain tissues and in vitro studies have identified several miRNAs implicated in PD. MiR-133b was shown to be downregulated in PD brains and to promote the survival of dopaminergic neurons [4]. MiR-433 was related with PD through targeting the FGF20, which in turn regulates the expression of α -synuclein [5]. MiR-7 targets α -synuclein and could regulate oxidative stress and cell death, while miR-184 and let-7 regulate dopaminergic neurons survival and activity [6, 7]. Recently, a miRNA

profiling of PD brains identified early downregulation of miR-34b/c, modulating mitochondrial function in areas with pathological affectation [8].

Plasma (circulating) miRNAs have been proposed as biomarkers for several diseases and aging [9, 10]. Our aim was to characterize the plasma miRNA profile in PD patients and healthy controls, to determine its usefulness as a biomarker for PD. The study was approved by the Ethical Committee of Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki and all the participants signed an informed consent. The study cohort consisted of sex- and age-matched healthy controls ($n = 25$; mean age 67.6; 52 % males) and patients ($n = 31$; mean age 63.9; 55 % males) who fulfilled the PD-clinical diagnosis criteria [11]. None of the patients were receiving drugs for PD-treatment or had a diagnosis of cardiovascular or tumor disease.

Full details of the experimental procedure are available as supplementary material. Briefly, blood was collected in tubes with EDTA, centrifuged and plasma was aliquoted (350 μ l). A total of 2 pg of a synthetic *Arabidopsis thaliana* miRNA (*Ath*-miR-159a; 5 μ l of a 0.4 pg/ μ l dilution) was immediately added and each aliquot stored at -80 °C until use. *Ath*-miR-159a was used as control of the extraction process (supplementary material). Total plasma RNA was extracted (TRIzol[®] LS Reagent, Ambion) and resuspended in 25 μ l of RNase-free water. Five μ l of each sample were retrotranscribed (RT) with the Megaplex RT primers Human pool A and TaqMan microRNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems). Three μ l of the RT product were pre-amplified with the Megaplex Preamp primers Human pool A and TaqMan Universal Master Mix no AmpErase UNG (Applied Biosystems). All the pre-amplifications were assayed with a custom *Ath*-miR-159a Taqman assay in an ABI 7500 Real-Time PCR (Applied

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00415-013-6900-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. F. Cardo · E. Coto · L. de Mena · V. Alvarez
Genética Molecular-Laboratorio de Medicina,
Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

E. Coto
Department of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain

R. Ribacoba · G. Moris · M. Menéndez
Neurología, Hospitales Universitario Central Asturias
and Álvarez Buylla-Mieres, Asturias, Spain

V. Alvarez (✉)
Genética Molecular, Hospital Central Asturias-Maternidad,
33006 Oviedo, Spain
e-mail: victoria.alvarez@sespa.princast.es

Biosystems) and only samples with CTs in the range of 20–26 cycles were further processed. Thus far, no reliable endogenous control miRNA has been established to normalize plasma miRNA content, although several have been proposed. We assayed two normalization candidates (miR-191 and miR-223) and found that miR-191 was constitutively amplified in our samples showing the lowest inter-individual variability in patients and controls. All the expression values were thus normalized against miR-191.

In a first step, we searched for plasma PD-candidate miRNAs by analysing 384 miRNAs from three pools of PD

patients and three pools of controls. Each pool contained pre-amplifications of four individuals, and were assayed with TaqMan low density miRNA (TLDA) cards on an ABI 7990 HT Fast Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems). The amplification of each miRNA was normalized against miR-191. The following miRNAs were significantly overrepresented (mean fold changes calculated with the RQ manager v.1.2 software) in patients: miR-181c, miR-331-5p, miR-193a-3p, miR-196b, miR-454, miR-125a-3p, and miR-137. In a second step, the seven candidate miRNAs were individually assayed in 31 patients and 25 controls (including the individuals used to create the pools). Briefly, each pre-amplification was quantified by duplicate with custom Taqman assays in an ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) and normalized against miR-191. Each patient's miRNA was compared with the level of the miRNA in a pool of all the controls. Only miR-331-5p mean RQ value was significantly higher in the patients compared to the controls (1,905 vs. 88; $p = 0.001$; Mann–Whitney's U test) (Fig. 1).

Some miRNAs have been proposed as plasma biomarkers for neurodegenerative disorders and processes affecting the central nervous system [12, 13]. However, to our knowledge no studies describing the plasma miRNA profile in plasma from PD patients have been reported. Two studies with blood cells and total blood were recently published. The first one determined the expression profile in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 19 patients and 13 controls and identified several miRNAs deregulated in this cell type [14]. The other one identified several candidate miRNAs in total peripheral blood [15]. None of the candidate miRNAs identified in these studies were found to be overrepresented in our patients. These

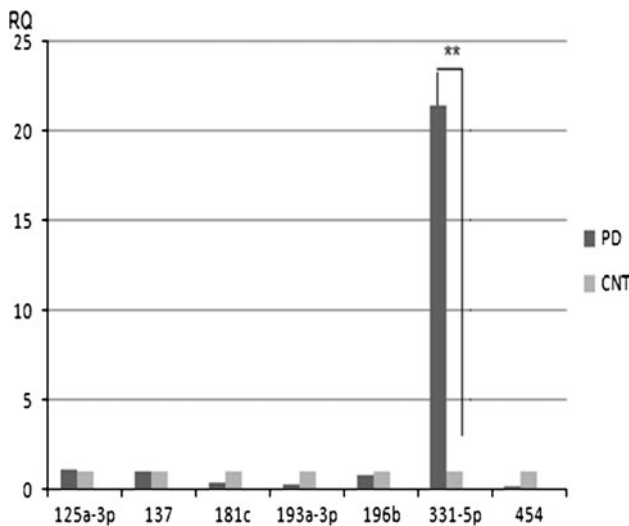


Fig. 1 Mean RQ values for the seven candidate miRNAs in PD ($n = 31$), and controls (CNT; $n = 25$). Plasma levels were normalized against the miR-191. Only miR-331-5p showed statistically significant difference between the two groups ($p = 0.001$). $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta Ct = (Ct \text{ miRNA} - Ct \text{ miR-191})$, $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ miRNA} - \Delta Ct \text{ controls pool})$

Table 1 MiRNA-331-5p predicted target genes and likely related pathways

Pathway	Gene	$-\ln(p \text{ value})$	Pathway ID
Axon guidance	SRGAP3, EPHA4, GNAI1	4.3	hsa04360
Insulin signaling pathway	PPARGC1A, SHC3, PPP1R3A	3.8	hsa04910
Chronic myeloid leukemia	SHC3, SMAD4	2.7	hsa05220
TGF-beta signaling pathway	SMAD6, SMAD4	2.2	hsa04350
Keratan sulfate biosynthesis	B3GNT1	2.1	hsa00533
Alkaloid biosynthesis II	MYST4	1.7	hsa00960
Glycosphingolipid biosynthesis-neo-lactoseries	B3GNT1	1.5	hsa00602
MAPK signaling pathway	ATF2, MEF2C, DUSP1	1.5	hsa04010
1- and 2-Methylnaphthalene degradation	MYST4	1.4	hsa00624
Tight junction	CASK, GNAI1	1.2	hsa04530
Phenylalanine metabolism	MYST4	1.2	hsa00360
Benzoate degradation via CoA ligation	MYST4	1.1	hsa00632
Limonene and pinene degradation	MYST4	1.1	hsa00903
Aminosugars metabolism	GNPDA2	1.1	hsa00530

discrepancies could be mainly explained by the fact that the three studies analyzed different blood sample types: purified cells, total blood and plasma. In addition, these studies would exclude blood-cell origin for this PD-circulating miRNA.

Finally, we performed a bioinformatic analysis of genes that are predicted to have miR-331-5p target sites in their 3' UTR and identified several candidates that were implicated in molecular pathways associated with the nervous system (DIANA miRPath 2.0; <http://diana.cslab.ece.ntua.gr/>) (Table 1). Among others, the pathways related with neurogenesis and neurodegeneration could be involved.

In conclusion, we found miR-331-5p as a possible circulating miRNA in PD patients. This miRNA could be useful for diagnostic purposes or monitoring disease progression and treatment responses. However, our study was based on a limited number of patients at onset stage and requires further replication in larger cohorts of patients at different disease stages.

Acknowledgments Authors thank the “Fundacion Parkinson Asturias” and “Obra Social Cajastur” for their support. This work was supported by grant 11/0093 from the Spanish “Fondo de Investigaciones Sanitarias-Fondos FEDER” European Union. LFC and LDM are predoctoral fellowships of FICYT-Principado de Asturias.

Conflicts of interest The authors declare no conflicts of interest.

References

- Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121–134
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 31:763–780
- Eacker SM, Dawson TM, Dawson VL (2009) Understanding microRNAs in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 10:837–841
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317:1220–1224
- Wang G, van der Walt JM, Mayhew G, Li YJ, Zuchner S, Scott WK, Martin ER, Vance JM (2008) Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 82:283–289
- Junn E, Lee KW, Jeong BS, Chan TW, Im JY, Mouradian MM (2009) Repression of alpha-synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13052–13057
- Gehrke S, Imai Y, Sokol N, Lu B (2010) Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 466:637–641
- Minones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, Espinosa-Parrilla Y, Ferrer I, Estivill X, Martí E (2011) MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum Mol Genet* 20:3067–3078
- Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N (2011) Circulating microRNAs: association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 80:193–208
- Olivieri F, Spazzafumo L, Santini G, Lazzarini R, Albertini MC, Rippo MR, Galeazzi R, Abbatecola AM, Marcheselli F, Monti D, Ostan R, Cevenini E, Antonicelli R, Franceschi C, Procopio AD (2012) Age-related differences in the expression of circulating microRNAs: miR-21 as a new circulating marker of inflammation. *Mech Ageing Dev* 133:675–685
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinicopathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:181–184
- Geekiyana H, Jicha GA, Nelson PT, Chan C (2012) Blood serum miRNA: non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 235:491–496
- Li X, Khanna A, Li N, Wang E (2011) Circulatory miR34a as an RNA based, noninvasive biomarker for brain aging. *Aging (Albany NY)* 3:985–1002
- Martins M, Rosa A, Guedes LC, Fonseca BV, Gotovac K, Violante S, Mestre T, Coelho M, Rosa MM, Martin ER, Vance JM, Outeiro TF, Wang L, Borovecki F, Ferreira JJ, Oliveira SA (2011) Convergence of miRNA expression profiling, alpha-synuclein interaction and GWAS in Parkinson's disease. *PLoS ONE* 6:e25443
- Margis R, Rieder CR (2011) Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *J Biotechnol* 152:96–101