

Análisis de mutaciones en los genes PINK1 Y PARKIN en pacientes colombianos con enfermedad de Parkinson

Carolina Andrea Infante Molina^{1,2}, Bacterióloga; Laura Marlen Mora Forero^{1,2}, Bacterióloga; Jenny C. Ortega Rojas¹, M. Sc; Carlos E. Arboleda-Bustos¹, Ph.D; William Fernández¹, Ph.D; Humberto Arboleda¹, M. Sc; Gonzalo Arboleda^{1*}, Ph.D.

1. Grupo de Neurociencias, Facultad de Medicina e Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

2. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia.

Correspondencia: gharboledab@unal.edu.co.

Recibido: 25/02/2014 **Aceptado:** 05/06/2014

Resumen

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo complejo, caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta*. Factores tanto ambientales como genéticos se ha determinado que contribuyen a su desarrollo. Mutaciones en los genes *PINK1* y *PARKIN* han sido asociadas con la enfermedad de inicio temprano e historia familiar. El objetivo del presente estudio fue identificar mutaciones en los genes *PINK1* (exones 4 y 6) y *PARKIN* (exones 2 y 7) en 22 pacientes colombianos con enfermedad de Parkinson de inicio temprano y/o antecedentes familiares, mediante amplificación por PCR y secuenciamiento. Las secuencias se compararon con la secuencia consenso de referencia. Se detectó una mutación homocigota de cambio en el marco de lectura (*frameshift*) c.155delA en el exón 2 del gen *PARKIN* en una paciente con inicio temprano de la enfermedad e historia familiar. Además se identificó la presencia de un polimorfismo en el intrón 2 del gen *PARKIN* en siete pacientes, uno de ellos en estado homocigoto. No se encontraron mutaciones en los exones 4 y 6 del gen *PINK1*. Se encontró una mutación homocigota c.155delA en el exón 2 de *PARKIN* de una paciente con la enfermedad de Parkinson de inicio temprano con historia familiar. No se encontraron cambios en el gen *PINK1*.

Palabras clave: enfermedad de Parkinson, mutaciones, PCR, secuenciación directa de ADN.

Analysis of mutations in the genes pink1 and parkin in Colombian patients with Parkinson's disease

Abstract

Parkinson's disease is a complex neurodegenerative disorder, characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons of the substance nigra pars compacta. It has been determined that factors both environmental and genetic contribute to its development. Mutations in the genes PINK1 and PARKIN have been associated with the early onset of disease and family history. The goal of this study was to identify mutations in the PINK1 genes (exons 4 and 6) and PARKIN (exons 2 and 7) in 22 Colombian patients with Parkinson's disease of early onset and/or family history, by PCR amplification and sequencing. The sequences were compared with the reference consensus sequence. A homozygous change mutation was detected in the reading frame (frame shift) c.155delA in exon 2 of the PARKIN gene in a patient with early onset of the disease and family history. In addition, the presence of a polymorphism in intron 2 of the PARKIN gene was identified in seven patients, one of them in homozygous state. Mutations were not found in exons 4 and 6 of the gene PINK1. A homozygous mutation c.155delA in exon 2 of PARKIN was found in a female patient with Parkinson's disease early onset with family history. No changes to the gene PINK1 were found.

Key Words: direct DNA sequencing, mutations, Parkinson's disease, PCR.

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo desorden neurodegenerativo más común después de la enfermedad de Alzheimer (1, 2), caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) y la presencia de cuerpos de Lewy en las neuronas que sobreviven a esta muerte celular (3). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la EP afecta aproximadamente a 6.3 millones de personas en todo el mundo. En Colombia en el 2003 se reportó una prevalencia de EP de 4.7 por 1000 habitantes (4) y en 2011 se alcanzaron cifras de 230 mil personas afectadas, según la Liga colombiana de Parkinson.

La causa de la EP no se conoce en su totalidad, pero la interacción de factores ambientales y genéticos se asocian a su etiología, lo que determina la presentación de la enfermedad en su forma esporádica (90-95%) o familiar (5-10%) (2,5). Para el 2012, 18 locus han sido asociados con la enfermedad (6). *PINK1* Y *PARKIN* son genes cuyas mutaciones han sido asociadas a la EP de inicio temprano (*EOPD*:

del inglés *Early-Onset Parkinson's Disease*), tanto en la formas familiares como esporádicas (7-9). En la presentación familiar las mutaciones en estos genes se heredan con un patrón autosómico recesivo. La prevalencia de las mutaciones en estos dos genes varía dependiendo del grupo étnico y la zona geográfica (7). Para *PINK1* se reporta una prevalencia de 1-9% en los casos de inicio temprano (2,10,11) y para *PARKIN* en un 50% en casos de inicio juvenil, 10-25% en casos esporádicos de inicio temprano y menos del 5% en casos esporádicos de inicio tardío (2,11,12). En Colombia son pocos los estudios acerca de mutaciones en estos genes.

PINK1 codifica para una serina treonina quinasa (10,13) y *PARKIN* codifica para una ligasa de ubiquitina E3, que participa en mecanismos de degradación proteica (14,15). Las funciones de estas proteínas en la EP no se han esclarecido por completo, pero de forma importante participan en vías de regulación de la homeostasis mitocondrial y procesos de mitofagia (2,13,16).

El propósito del presente estudio fue identificar mutaciones en los genes *PINK1* (exones 4 y 6) y *PARKIN* (exones 2 y 7) en pacientes colombianos con EP de inicio temprano y/o antecedentes familiares, mediante amplificación por PCR y secuenciamiento.

Materiales y métodos

Pacientes

Se analizaron un total de 22 muestras de pacientes colombianos con EP de inicio temprano y/o historia familiar escogidos por el método de muestreo no probabilístico intencional o por conveniencia aplicando los criterios de inclusión: (i) inicio temprano y/o historia familiar, (ii) Los pacientes fueron valorados previamente por un grupo de profesionales del grupo de Movimientos Anormales de la Universidad Nacional de Colombia, mediante los criterios de la Parkinson's UK Brain Bank (17-19). La edad de inicio temprano de la enfermedad se tomó como presencia de signos de Parkinson antes de los 40 años (7, 20); inicio juvenil antes de los 20 años (21, 22). Se obtuvo una muestra de sangre periférica por venopunción, con firma previa del consentimiento informado.

Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el kit comercial, Quick-gDNA™ MiniPrep (ZYMO Research Corp, Irvine, Estados Unidos), siguiendo el protocolo establecido. La comprobación de la extracción se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Amplificación por PCR

La amplificación de *PINK1* (exones 4 y 6) y *PARKIN* (exones 2 y 7) se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *primers* específicos previamente reportados (21, 23) que amplifican las regiones de unión intrón-exón para las regiones de interés. Las concentraciones finales de los reac-

tivos para la amplificación de todos los exones fueron las mismas: buffer 1X, 0.4μM de cada uno de los *primers*, 10mM de dNTPS y 0.625U de taq polimerasa; para los exones 6 de *PINK1* y 2 de *PARKIN* la concentración de MgCl₂ fue de 1mM y para los exones 4 de *PINK1* y 7 de *PARKIN* fue de 1.5mM.

El programa de PCR utilizado para los exones de *PINK1* y el exón 2 de *PARKIN* fue de una etapa de denaturación inicial a 95°C por tres minutos, 1 ciclo de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridación (exón 4: 63.2°C; exón 6: 56.9°C; y exón 2: 55.0°C, todos por 30 segundos) y extensión a 72°C, por 30 ciclos; y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Para el exón 7 de *PARKIN* se utilizó una PCR con un protocolo de rampa decreciente de temperaturas que fueron bajando de 58° a 48°C, es decir 0.5°C por ciclo.

Secuenciación directa de ADN

Para la purificación de los amplificados se utilizó el método de etanol-acetato de amonio y finalmente se realizó una mezcla de secuenciación para su procesamiento en el servicio de Secuenciación del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia mediante la metodología de BigDye siguiendo el protocolo del fabricante (Applied Biosystem, Foster City, Estados Unidos). Para el análisis de los cromatogramas se utilizaron los programas bioinformáticos Bioedit (24) y Chromas (Technelysium Pty Ltd.) para determinar la calidad de las secuencias y NovoSnp (25) para realizar la alineación de las secuencias con el gen de referencia.

Resultados

De los 22 pacientes con EP de inicio temprano y/o historia familiar analizados, 18 fueron mujeres y 19 hombres, Figura 1.

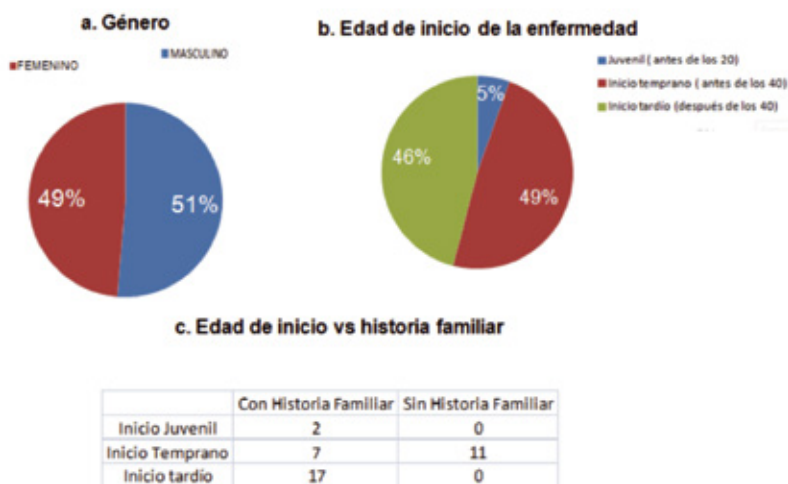


Figura 1. Características demográficas de los pacientes analizados con Enfermedad de Parkinson. **a.** De los pacientes analizados 49% fueron mujeres y 51% hombres. **b.** De los 22 individuos solamente dos presentaron EP de inicio juvenil (5%); 18 EP de inicio temprano (49%) y 17 EP de inicio tardío (46%). **c.** Los dos pacientes de inicio juvenil, siete de los pacientes de inicio temprano y todos los de inicio tardío tenían antecedentes familiares.

Después de analizar las 88 secuencias, se encontró en la muestra PK154 una mutación de cambio en el marco de lectura (*frameshift*) c.155delA en el exón 2 del gen *PARKIN* (Figura 2a), la cuál ha sido reportada en otras poblaciones incluyendo la colombiana (26-28). En los 21 pacientes restantes no se encontraron otras alteraciones en el gen *PARKIN*.

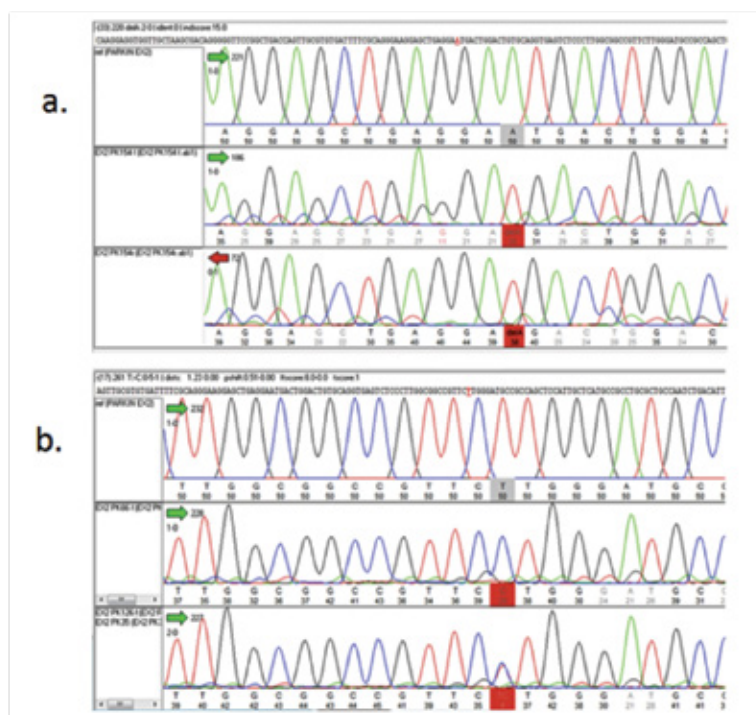


Figura 2. Análisis de mutaciones en los casos analizados. **a.** Electroferograma del secuenciamiento del exón 2 del gen *PARKIN* en donde se muestra la mutación c.155delA en el exón 2. Se muestra la secuencia virtual de consenso del gen de referencia, la secuencia PK154 forward, y secuencia PK154 reverse. **b.** Electroferograma que muestra el polimorfismo rs.2075923 en el intrón 2-3 del gen *PARKIN*. Se muestra la secuencia virtual de gen de referencia y dos de los siete pacientes, uno en estado homocigoto y otro en estado heterocigoto. Visualizado software NovoSNP (25).

Para conocer el efecto de esta mutación en procesos celulares como la regulación de la transcripción y traducción de la proteína se hacen necesarios estudios de epigenética y de RNAm; además de estudios funcionales en diferentes tipos celulares para evaluar dinámica mitocondrial, mecanismos de degradación proteica y muerte celular.

En Colombia, la presencia de esta mutación ya se ha reportado previamente, encontrándose en forma homocigota en una familia consanguínea (28). Dado el gran número de reportes de esta mutación en Europa, especialmente en Francia y España (26,27,38), se ha sugerido que la mutación tendría un origen ancestral europeo asociado a la colonización y mezcla poblacional en Colombia (28). Según el análisis genealógico de la paciente PK154, se podría inferir que sus dos hermanos afectados, con inicio temprano de la enfermedad, son homocigotos para la misma mutación. Así mismo, se puede deducir que sus padres y su hija son portadores heterocigotos aparentemente sanos. Al parecer el estado heterocigoto inferido en los padres e hija no conlleva al desarrollo de la enfermedad, como ha sido reportado en estudios previos en los que se ha encontrado la mutación en estado heterocigoto en individuos asintomáticos (27,31,39). Sin embargo, otros estudios han encontrado esta mutación en estado heterocigoto en paciente con EP (7,40) y casos de heterocigotos compuestos (41). De tal forma que el papel fisiopatológico de esta mutación en forma heterocigota sigue siendo controversial (7,40). Se sugiere evaluar la presencia de esta mutación en estos familiares y si es posible en otros familiares.

No se encontraron cambios en las secuencias analizadas del gen *PINK1*, similar a lo descrito en otras poblaciones (1,42,43). El polimorfismo observado (IVS2 + 25T>C; rs2075923) ha sido previamente reportado (26,30) y no se ha encontrado una asociación entre esta variante y la EP (29).

Los resultados de esta investigación corroboran la baja frecuencia de mutaciones en los genes *PINK1* y *PARKIN* en las regiones analizadas en casos con historia familiar o inicio temprano de la EP en población colombiana. Es necesario, realizar un

estudio a mayor escala que vincule la totalidad del gen y análisis de variaciones en el número de copias de estos genes. Además, es importante la realización de estudios de asociación genética de variantes en estos dos genes para definir su participación como factores de riesgo en la EP esporádica.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con recursos del proyecto de la DIB-Universidad Nacional de Colombia y Colciencias.

Referencias

1. Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat.* 2010;31(7):763-780.
2. Qayyum A. Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease. In: Rana AQ, ed: InTech; 2011.
3. Fahn S, Jankovic J, Hallett M. Chapter 5 - Current concepts on the etiology and pathogenesis of Parkinson disease. *Principles and Practice of Movement Disorders 2° Edition* ed. Edinburgh: W.B. Saunders; 2011:93-118.
4. Pradilla AG, Vesga AB, Leon-Sarmiento FE. [National neuroepidemiological study in Colombia (EPINEURO)]. *Rev Panam Salud Publica.* 2003;14(2):104-111.
5. Pankratz ND, Wojcieszek J, Foroud T. Parkinson Disease Overview. 2009.
6. Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2007;6(7):652-662.
7. Camargos ST, Dornas LO, Momeni P, Lees A, Hardy J, Singleton A, et al. Familial Parkinsonism and early onset Parkinson's disease in a Brazilian movement disorders clinic: phenotypic characterization and frequency of SNCA, PRKN, PINK1, and LRRK2 mutations. *Mov Disord.* 2009;24(5):662-666.
8. Scornaienchi V, Civitelli D, De Marco EV, Annesi G, Tarantino P, Rocca FE, et al. Mutation analysis of the PINK1 gene in Southern Italian patients with early- and late-onset parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18(5):651-653.
9. Yonova-Doing E, Atadzhanov M, Quadri M, Kelly P, Shawa N, Musonda ST, et al. Analysis of LRRK2, SNCA, Parkin, PINK1, and DJ-1 in Zambian patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18(5):567-571.
10. Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2007;16 Spec No. 2:R183-194.
11. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 2011;26 Suppl 1:S1-58.
12. Fung HC, Chen CM, Hardy J, Singleton AB, Lee-Chen GJ, Wu YR. Analysis of the PINK1 gene in a cohort of patients with sporadic early-onset parkinsonism in Taiwan. *Neurosci Lett.* 2006;394(1):33-36.

13. Cookson MR, Bandmann O. Parkinson's disease: insights from pathways. *Hum Mol Genet.* 2010;19(R1):R21-27.
14. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Mino-shima S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* 2000;25(3):302-305.
15. Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(24):13354-13359.
16. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 2010;8(1):e1000298.
17. Douglas J. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Archives of Neurology.* 1999; Vol 56(1): 33-39.
18. Clarke CE. Parkinson's disease. *Bmj.* 2007;335(7617):441-445.
19. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(4):368-376.
20. Sironi F, Primignani P, Zini M, Tunesi S, Ruffmann C, Ricca S, et al. Parkin analysis in early onset Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008;14(4):326-333.
21. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 1998;392(6676):605-608.
22. Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, et al. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain.* 2003;126(Pt 6):1271-1278.
23. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 2004;304(5674):1158-1160.
24. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 1999;41:95-98.
25. Weckx S, Del-Favero J, Rademakers R, Claes L, Cruts M, De Jonghe P, et al. novoSNP, a novel computational tool for sequence variation discovery. *Genome Res.* 2005;15(3):436-442.
26. Abbas N, Lucking CB, Ricard S, Durr A, Bonifati V, De Michele G, et al. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet.* 1999;8(4):567-574.
27. Munoz E, Tolosa E, Pastor P, Marti MJ, Valldeoriola F, Campdelacreu J, et al. Relative high frequency of the c.255delA parkin gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2002;73(5):582-584.
28. Pineda-Trujillo N, Dulcey Cepeda A, Arias Pérez W, Moreno Masmela S, Saldarriaga Henao A, Sepúlveda Falla D, et al. Una mutación en el gen PARK2 causa enfermedad de Parkinson juvenil en una extensa familia colombiana. *Iatreia.* 2009;22(2):122-131.
29. Oliveira SA, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, et al. Association study of Parkin gene polymorphisms with idiopathic Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2003;60(7):975-980.
30. Solla P, Cannas A, Floris G, Murru MR, Corongiu D, Tranquilli S, et al. Parkin Exon Rearrangements and Sequence Variants in LRRK2 Mutations Carriers: Analysis on a Possible Modifier Effect on LRRK2 Penetrance. *Parkinsons Dis.* 2010;2010:537698.
31. Hoenicka J, Vidal L, Morales B, Ampuero I, Jimenez-Jimenez FJ, Berciano J, et al. Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol.* 2002;59(6):966-970.
32. Bras J, Guerreiro R, Ribeiro M, Morgadinho A, Januario C, Dias M, et al. Analysis of Parkinson disease patients from Portugal for mutations in SNCA, PRKN, PINK1 and LRRK2. *BMC Neurol.* 2008;8:1.
33. Dachsel JC, Mata IF, Ross OA, Taylor JP, Lincoln SJ, Hinkle KM, et al. Digenic parkinsonism: investigation of the synergistic effects of PRKN and LRRK2. *Neurosci Lett.* 2006;410(2):80-84.
34. Rawal N, Periquet M, Lohmann E, Lucking CB, Teive HA, Ambrosio G, et al. New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism. *Neurology.* 2003;60(8):1378-1381.
35. Okatsu K, Oka T, Iguchi M, Imamura K, Kosako H, Tani N, et al. PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nat Commun.* 2012;3:1016.
36. Tan JM, Wong ES, Lim KL. Protein misfolding and aggregation in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(9):2119-2134.
37. Johnson BN, Berger AK, Cortese GP, Lavoie MJ. The ubiquitin E3 ligase parkin regulates the proapoptotic function of Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(16):6283-6288.
38. Lesage S, Lohmann E, Tison F, Durif F, Durr A, Brice A. Rare heterozygous parkin variants in French early-onset Parkinson disease patients and controls. *J Med Genet.* 2008;45(1):43-46.
39. Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, et al. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology.* 2002;58(8):1239-1246.
40. Brooks J, Ding J, Simon-Sanchez J, Paisan-Ruiz C, Singleton AB, Scholz SW. Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available cases and control. *J Med Genet.* 2009;46(6):375-381.
41. Sun M, Latourelle JC, Wooten GF, Lew MF, Klein C, Shill HA, et al. Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study. *Arch Neurol.* 2006;63(6):826-832.
42. Chung EJ, Ki CS, Lee WY, Kim IS, Kim JY. Clinical features and gene analysis in Korean patients with early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2006;63(8):1170-1174.
43. Deng H, Le W, Shahed J, Xie W, Jankovic J. Mutation analysis of the parkin and PINK1 genes in American Caucasian early-onset Parkinson disease families. *Neurosci Lett.* 2008;430(1):18-22.