

Detección de polimorfismos en el gen Parkin como biomarcadores predictivos de la enfermedad de Parkinson

Martínez RH,¹ Saucedo O,² González CH,¹ Cantú-Martínez L,¹ Montes de Oca R,³ Rangel-Guerra R,¹ Sepúlveda J,³ Armendáriz I¹

RESUMEN

Introducción: La enfermedad de Parkinson se diagnostica por hallazgos clínicos, ya que se carece de un marcador biológico. La etiología es desconocida, aunque parecen participar procesos multifactoriales. Deleciones-duplicaciones y mutaciones puntuales del gen Parkin se han asociado al desarrollo de EP juvenil autosómica recesiva. Estudios en pacientes europeos y japoneses demuestran la importancia del gen Parkin en EP idiopática y juvenil. El gen Parkin se localiza en el cromosoma 6 y pertenece a las proteínas de la familia de la ubiquitina, las cuales están relacionadas en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. **Objetivo:** Determinar si el gen Parkin presenta polimorfismos en mexicanos con EP, identificar cuáles polimorfismos son los más frecuentes y definir la posibilidad de utilizarlo como biomarcador en la EP juvenil, idiopática o en ambas. **Material y métodos:** Fueron incluidos 50 pacientes con diagnóstico de EP y 60 controles pareados por edad. Todos los pacientes fueron evaluados mediante la escala UPDRS y se les realizó imagen de resonancia magnética de cerebro (IRM). En pacientes y controles se obtuvo ADN genómico a partir de linfocitos de sangre periférica. Por la técnica de la PCR se amplificaron los 12 exones del gen Parkin. Después de la amplificación con la técnica de PCR se procedió a realizar la técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) para la detección de polimorfismos. **Resultados:** La media de edad fue 65 años (33 hombres; 18 mujeres). El UPDRS en promedio fue de 31.78 puntos y la IRM resultó normal. En pacientes y controles se analizaron los 12 exones. No se encontró deleción en ningún exon. Se detectaron polimorfismos en el exon 3 en 10 pacientes (20%) en el exon 7 en un caso (2%) y ningún polimorfismo en los controles. Los polimorfismos fueron comprobados también en la técnica SSCP. Los pacientes con EP y polimorfismos tienen una media de 65 años y todos con EP idiopática. **Conclusión:** El presente estudio representa el primer análisis genético molecular en población mexicana con EP. La presencia de polimorfismos en el gen Parkin en EP juvenil e idiopática sugiere la existencia de un factor genético predisponente. Los polimorfismos encontrados pueden representar el inicio de la detección de un marcador biológico para el diagnóstico molecular temprano de la EP, además de marcar la pauta para posteriores estudios de farmacogenómica.

Palabras clave: enfermedad de Parkinson, polimorfismos, gen Parkin, exones, marcador biológico.

Rev Mex Neuroci 2004; 5(1): 7-12

Polymorphisms in the Parkin gene as predictive biologic markers in Parkinson's disease

ABSTRACT

Background: The etiology of Parkinson disease is unknown. Genetic and environmental factors have been involved. Mutations in Parkin gene were recently reported in familiar Parkinson's disease in several countries. So far, this evaluation has not been performed in Mexican population. **Objective:** In this work we focused in identify mutations and polymorphisms in the Parkin gene in patients with Parkinson disease in the population of the northeast of Mexico and the possibility for using them as a predictive biologic marker in juvenile or idiopathic Parkinson's disease or both. **Material and methods:** We included 50 patients with Parkinson's disease and 60 normal controls of the same age. All patients were evaluated through UPDRS, laboratory test and head MRI. Peripheral blood samples in patients and controls were obtained. From this sample leukocytes were separated and their DNA was extracted. Purified DNA was analyzed for the 12 exons of the Parkin gene by means of PCR in cases and controls. After amplification by means of PCR we performed the single chain conformational polymorphisms technique (SSCP) for detection of polymorphisms. **Results:** Ages ranged from 25 to 75 years old (mean 65 years). There were 33 males and 18 females. MRI was normal, brain atrophy was observed in half of the patients. The UPDRS revealed different stages of Parkinson's disease with an average of 31.78 points in the whole group (range 12 to 72). In patients and controls we analyzed 12 exons of the Parkin gene. There was no deletion in any exon. Analyses of DNA did not showed abnormalities in control patients whereas in Parkinson's disease patients an absence of exon 5 of the Parkin gene was detected in one female patient of 75 years old and exon 3 in female patient of 37 years old. We also observed polymorphisms in exon 3 in 10 patients (20%) and in the exon 7 in one case (2%). The polymorphisms were confirmed by SSCP technique. Patients with polymorphisms had idiopathic Parkinson's disease with a mean age of 65 years old. **Conclusions:** This study represent the first genetic molecular analysis in Mexican population with Parkinson's disease. The presence of polymorphisms in the Parkin gene suggests that a genetic factor is apparently involved at least in a subgroup of patients in population of northeast Mexico. The polymorphisms detected may represent the onset in the development of a biologic marker for an early diagnosis of Parkinson's disease.

Key words: Parkinson's disease, polymorphisms, exon, biologic marker, Parkin gene.

Rev Mex Neuroci 2004; 5(1): 7-12

1. Servicio de Neurología, Hospital Universitario UANL.
2. Centro de Investigación Biomédica del Noreste IMSS, Monterrey, N.L.
3. Departamento de Histología, Facultad de Medicina UANL.

Correspondencia: Dr. Héctor R. Martínez, FACP

Servicio de Neurología. Hospital Universitario UANL. Ave. Madero y Gonzalitos S/N. Col. Mitras Centro. Monterrey, N.L. México.

Tel.: (81) 8348-5885. Fax: (81) 8348-9266.

E-mail: hospitaluni@infosel.net.mx

INTRODUCCIÓN

El incremento en el promedio de vida del ser humano ha condicionado la presencia de mayor número de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo a la enfermedad de Parkinson (EP), que representan un serio problema de salud pública. La EP es un trastorno del movimiento de carácter progresivo. Se ha estimado que en nuestro país afecta a 0.5% de la población adulta. En los Estados Unidos existen alrededor de un millón de personas con EP y afecta de 1 a 2% de los adultos mayores de 65 años.

Los rasgos clínicos de esta enfermedad incluyen: temblor, bradicinesia, rigidez y trastorno en el balance. Esto se considera ocasionado por la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra y cuerpos de inclusión en el citoplasma neuronal (cuerpos de Lewy) en la EP idiopática.¹ Los eventos que condicionan la muerte de estas neuronas han estado sujetos a intensa investigación las últimas décadas. Se conocen dos subtipos de EP: a) Idiopática: inicia generalmente después de los 60 años y b) Juvenil autosómica recesiva (EPJ-AR), que se presenta antes de los 40 años. En la actualidad, el diagnóstico de la EP se efectúa con base en los rasgos clínicos, ya que no existe un marcador biológico. Cuando existen manifestaciones clínicas se ha determinado que más de 50% de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas han degenerado.

La etiología de la EP aún se desconoce. Resultados previos sobre la patogénesis de EP se inclinan por un proceso de tipo multifactorial, combinación de predisposición genética (mutaciones) y factores ambientales.²⁻⁶ Kitada y cols.⁷ asociaron la presencia de deleciones/duplicaciones y mutaciones puntuales en el gen Parkin con el desarrollo de la EPJ-AR. Posteriores estudios genéticos en familias europeas y japonesas han demostrado la gran importancia que tiene el gen Parkin en el desarrollo de los dos subtipos de EP.^{8,9}

El gen Parkin se localiza en el cromosoma 6q25.2-27.¹⁰ Su tamaño es de 500 kilobases y consta de 12 exones que codifican para una proteína de 465 aminoácidos. Parkin pertenece a las proteínas de la familia Ubiquitina, las cuales están involucradas en la patogénesis de varias enfermedades neurodegenerativas. La proteína del gen Parkin tiene función de ligasa de ubiquitina (E3)¹¹⁻¹³ y se cree que tiene un papel importante en la degradación de proteínas. Previos estudios en familias japonesas y europeas han reportado la presencia de mutaciones en todos los exones del gen Parkin, incluyendo la región promotora.¹⁴⁻¹⁶ Varios trabajos han reportado pacientes con EP heterocigotos para mutaciones en

el gen Parkin y sugieren que la falta de expresión debido a una haploinsuficiencia pudiera ser un factor de riesgo para la muerte de las neuronas dopaminérgicas.¹⁷

La presencia de las mutaciones reportadas y la falta de estudios en mexicanos con EP nos motivó a desarrollar el presente análisis molecular. Además de identificar el tipo de mutación más frecuente en nuestra población. El detectar mutaciones genéticas en forma consistente nos puede proporcionar la posibilidad de producir marcadores biológicos que sirvan en el diagnóstico molecular temprano. El objetivo del presente trabajo es determinar si el gen Parkin presenta polimorfismos en la EP en población mexicana e identificar los polimorfismos más frecuentes mediante la técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP).

MATERIAL Y MÉTODOS

De los pacientes que acuden a Consulta Externa del Servicio de Neurología del Hospital Universitario UANL en Monterrey, N.L., se ingresaron al presente estudio 50 pacientes con EP y 60 controles pareados por edad. Los pacientes y controles autorizaron participar en el estudio firmando la carta de consentimiento. Los controles recibieron evaluación clínica por neurólogos para excluir la posibilidad de alguna enfermedad neurodegenerativa.

El diagnóstico de la EP se estableció por datos clínicos, apoyados en los criterios diagnósticos del Banco de Cerebros de la Sociedad de Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UKPDSBB), la Escala Estadificadora Unificada de la Enfermedad de Parkinson (UPDRS). Además de la realización de pruebas psicométricas, estudios electrofisiológicos (EEG) y resonancia magnética de cerebro.

El ADN genómico de pacientes y controles se obtuvo a partir de linfocitos de sangre periférica. Los linfocitos después de la lisis de eritrocitos se digirieron durante 3 horas a 37 °C con proteinasa K. Posteriormente el ADN genómico se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol al 100%. El ADN genómico purificado se cuantificó y se diluyó a una concentración de 50 ng/ μ L.

Se utilizaron 50 ng como plantilla para la amplificación de los 12 exones del gen Parkin mediante la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se utilizaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de cada uno de los 12 exones. El programa utilizado para la amplificación de todos los exones fue: 1) desnaturalización, inicia a 94 °C por dos minutos; 2) 20 ciclos con los siguientes pasos: (a) desnaturalización a 94 °C por un minuto; (b) alineación a 60 °C por un minuto; (c) elongación a

68 °C por dos minutos; 3) extensión prolongada a 68 °C por cinco minutos. Los productos de PCR amplificados (el tamaño de los exones es entre 60 y 255 pb), fueron analizados mediante geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y observados mediante un transiluminador con luz UV. Una vez que se comprobó la presencia del exon en cuestión, se procedió a su análisis mediante la técnica de polimorfismo conformacional de cadena sencilla para la detección de mutaciones puntuales.¹⁸

Los productos de PCR obtenidos se analizaron en un gel no desnaturante de acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 8%. Los geles fueron procesados para su tinción con nitrato de plata. Los geles fueron escaneados para su interpretación. Las muestras que presentaron un polimorfismo, se identificaron para repetirse dos veces más la técnica de SSCP.

RESULTADOS

Se incluyeron 50 pacientes con EP en quienes la edad fluctuó de 32 a 82 años (\bar{X} = 65 años). El mayor porcentaje correspondió al sexo masculino (33 hombres y 18 mujeres). La evaluación clínica inicial mostró un promedio en la escala UPDRS de 31.78 puntos (rango: 12 a 72 puntos). La IRM excluyó la presencia de lesiones intracraneales, no obstante la mitad de los pacientes mostró discreta atrofia cortical.

El ADN genómico obtenido de pacientes y controles se corrió en gel de agarosa al 0.8%. La migración del ADN genómico correspondió a ADN de alto peso molecular de acuerdo con su posición observada por arriba de la banda de 12 kb del marcador de peso molecular utilizado. En la figura 1 se observa el ADN genómico de un individuo control y dos pacientes que muestran el ADN genómico en buenas condiciones. En cuanto a la concentración obtenida, varió entre 200 a 600 ng/ μ L.

Amplificación de los exones en individuos normales

La figura 2 muestra la estrategia utilizada para la amplificación de los 12 exones del gen Parkin, así como sus respectivos tamaños esperados. Mediante la técnica de PCR se logró la amplificación del ta-

maño correcto de cada uno de los 12 exones que componen el gen Parkin descritos en la figura 2. En la figura 3 se muestran los productos amplificados de los 12 exones del gen Parkin mediante la técnica de PCR a partir del ADN genómico de un individuo sano. Los productos amplificados mostraron el tamaño esperado de acuerdo con el marcador de peso molecular utilizado.

Amplificación de los exones en pacientes con EP

Al utilizar los mismos oligonucleótidos se amplificó cada uno de los 12 exones del gen Parkin a partir del ADN genómico de pacientes con EP. Los productos de ADN amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 3% junto a su respectivo control.

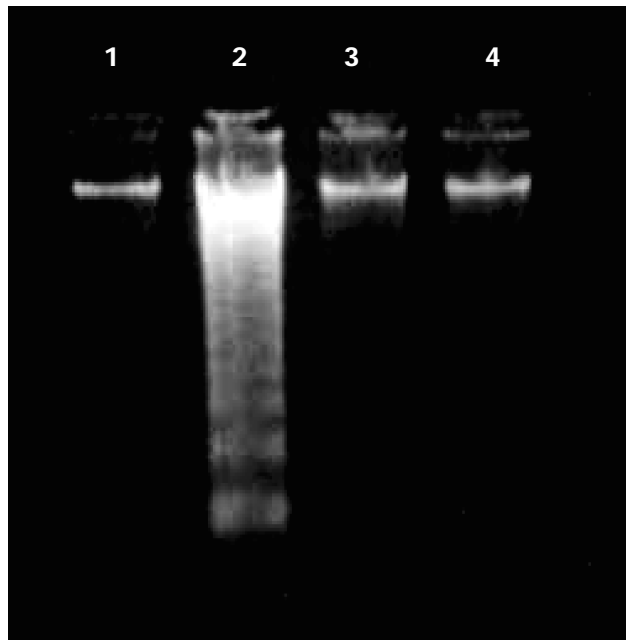


Figura 1. ADN genómico purificado a partir de sangre periférica de controles y pacientes. En el carril 1 se muestra el ADN genómico correspondiente a un individuo control. Carriles 3 y 4 muestran el ADN genómico de dos pacientes con enfermedad de Parkinson. En el carril 2 se corrió un marcador de peso molecular conocido para comprobar el alto peso molecular de las muestras de ADN genómico obtenidas.

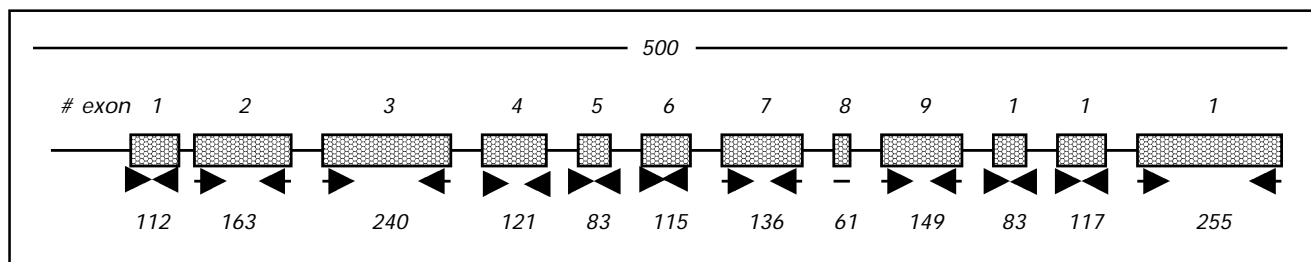


Figura 2. Estrategia para la amplificación de los exones del gen Parkin. Las flechas indican la ubicación de los oligonucleótidos. Los cuadros corresponden a los exones.

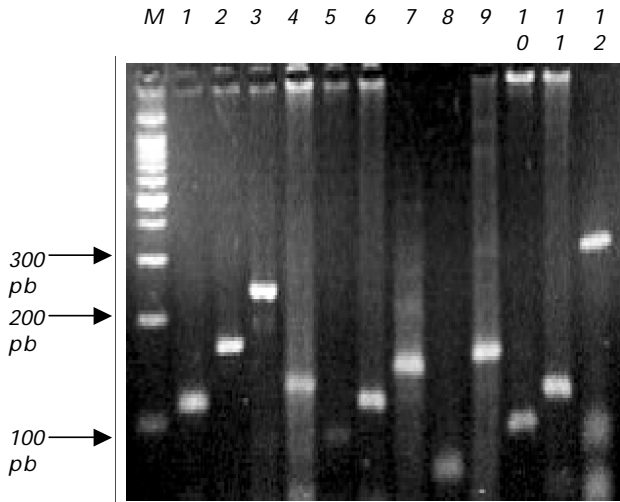


Figura 3. Amplificación de los 12 exones del gen Parkin. Los productos de PCR correspondientes a cada uno de los 12 exones de un individuo control se corrieron en un gel de agarosa al 3%. M = Marcador molecular de 100 pb. Los números de los carriles corresponden al mismo número del exon.

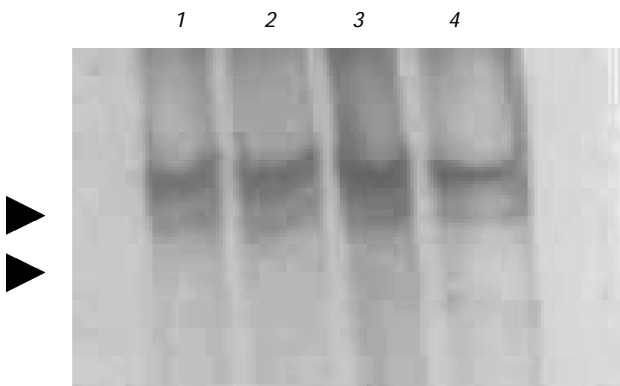


Figura 4. Análisis SSCP de personas control. Los cuatro carriles muestran las bandas (▶) correspondientes a cada una de las cadenas sencillas de la cadena doble del ADN del producto de PCR del exon 3 en individuos control.

Todos los pacientes mostraron el tamaño correcto de los 12 exones amplificados, lo cual indica que al menos estos pacientes no poseen una delección homocigota para cada uno de sus exones del gen Parkin.

Presencia de polimorfismos en el gen Parkin en pacientes con EP

La búsqueda de polimorfismos en los exones del gen Parkin se realizó mediante un análisis por SSCP. Para esto, los productos de PCR de cada uno de los exones, los cuales están en doble cadena, se desnaturalizaron para separarlos en cadena sencilla y posteriormente se renaturalizaron rápidamente para que las cadenas sencillas adquirieran su propia con-

formación, y finalmente se corrieron en geles de poliacrilamida al 8%. En la figura 4 se muestra el análisis SSCP de un individuo control. Cada una de las bandas intensas (flechas) corresponde a cada una de las cadenas sencillas de la cadena doble del ADN del producto de PCR. Este mismo patrón se observó en un total de 60 pacientes. Habiendo estandarizado el procedimiento procedimos a analizar por SSCP a los pacientes con EP.

En caso de existir algún cambio de nucleótido en el gen Parkin de los pacientes se cambiaría la estructura secundaria adoptada por las cadenas sencillas y esto se manifestaría en su movilidad a través del gel tomando una posición diferente a las bandas de los controles. Al analizar los productos de amplificación de los exones 2, 3, 4, 6, 7, 9 y 11 del gen Parkin de los pacientes mediante SSCPs nos encontramos que 10 de ellos (20%) mostraron un patrón diferente al normal. En la figura 5 se observa un cambio en el patrón de corrimiento, indicativo de un polimorfismo, en el exon 3 de los pacientes con EP. Este tipo de polimorfismo en el exon 3 se presentó en 10 pacientes. Los diez pacientes con polimorfismo correspondieron con EP idiopática con edad promedio de 65 años de edad. El otro polimorfismo detectado en el gen Parkin correspondió al exon 7 y sólo se detectó en un paciente (2%) con EP idiopática de los 50 analizados. Para confirmar en forma contundente la presencia de los polimorfismos, el análisis mediante SSCP se repitió dos veces más con los mismos resultados comprobando la presencia del polimorfismo. En los 60 controles no se demostró ningún polimorfismo.

DISCUSIÓN

En las investigaciones recientes se ha sugerido que el origen de la EP es multifactorial. Se considera que puede ser originada por factores ambientales, mutaciones genéticas o interacción de ambas condiciones. Avances en la genética de la EP han ocurrido en

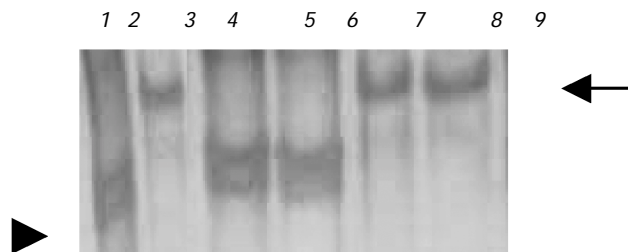


Figura 5. Polimorfismos del exon 3 del gen Parkin mediante la técnica de SSCP en pacientes con EP. En el carril 1 se muestran (cabeza de flecha) las bandas de DNA normales del producto de PCR del exon 3 en un individuo control. Las bandas de los carriles 2, 3, 8 y 9 corresponden al polimorfismo (flecha) del exon 3 en pacientes con EP y en los carriles del 4 al 7 corresponden a pacientes con EP sin polimorfismo para el mismo exon 3.

los últimos años y evolucionan rápidamente con la identificación de mutaciones en varias proteínas celulares. La primera mutación asociada con la EP se describió en el gen de la α -Sinucleína, una proteína localizada en las terminales presinápticas y componente mayor de los cuerpos de Lewy. Otras dos mutaciones han sido identificadas en las formas hereditarias de EP y que involucran al sistema de la ubiquitina (diseñado para eliminar proteínas dañadas o desdobladas dentro de la célula). Estas mutaciones incluyen al gen Parkin y al gen UCH-L1 (ubiquitín carboxilasa hidrolasa L1).

Originalmente, mutaciones en el gen Parkin fueron reportadas en familias japonesas.⁷ Posteriores estudios describieron la presencia de mutaciones en este gen en familias europeas. En población mexicana con EP aún no existe información alguna de la participación genética en esta entidad neurológica. En el presente reporte describimos la presencia de polimorfismos en dos exones del gen Parkin en pacientes mexicanos con EP. El polimorfismo fue detectado en exones 3 y 7, los cuales no se encontraron en los 60 controles sanos analizados. El porcentaje de 22% de pacientes con EP mostrando la presencia de este polimorfismo nos indica que las alteraciones del ADN encontradas están estrechamente asociadas con la EP.

En los estudios iniciales de factores genéticos en la EP, se pensó que mutaciones en el gen Parkin eran exclusivas de la EP juvenil y más aún que sólo se presentaba en EP juvenil con genotipo homocigoto para la mutación del gen Parkin. Nuestros resultados están a favor de otros reportes recientes que demuestran que la presencia de mutaciones en el gen Parkin no es exclusiva de la EP juvenil. En la presente serie, los pacientes que mostraron polimorfismos en el gen Parkin tenían el diagnóstico de EP idiopática y contaban con un promedio de edad de 65 años. Contrario a la delección de exones detectadas en pacientes de familias europeas y japonesas, en el presente estudio no encontramos delección de exones. En todas las muestras de ADN genómico analizado de pacientes con EP y controles se logró amplificar los 12 exones.

Estudios previos han reportado la presencia de mutaciones en todos los exones del gen Parkin. Sin embargo, en nuestro estudio, aparte de no encontrar delecciones de exones, los polimorfismos hallados de los 6 exones analizados (2, 3, 4, 6, 7, 9, 11) mediante la técnica de SSCP fueron bastante restringidos únicamente a 2 exones, el 3 y 7. Es importante resaltar el porcentaje alto (22%) de polimorfismos que encontramos en nuestra población de pacientes con EP, lo cual nos permitiría en un futuro contar con un marcador biológico para el diagnóstico de la enfermedad en forma temprana. Han

sido pocos los casos de pacientes con EP mostrando mutaciones en el exon 3. El hecho de haber encontrado mayor número de pacientes con polimorfismo en el exon 3, sugiere que existe un factor genético predisponente además del ambiental que participa en el desarrollo de la EP en nuestra población del norte del país.

El hecho de encontrar polimorfismos en el exon 3 de los pacientes con EP y no detectarlos en ninguno de los 60 individuos control apareados por edad, sugiere la existencia de una de las siguientes posibilidades o ambas: (1) que los individuos son homocigotos para dicho polimorfismo, es decir, que el cambio de nucleótido se encuentra en ambos de sus alelos, o (2) que poseen un polimorfismo en uno de sus alelos y delección en otros de sus alelos en el exon 3.

Con respecto al polimorfismo detectado en el exon 7 en un solo paciente, de acuerdo con las bandas detectadas en el análisis por SSCP, observamos un patrón de 4 bandas totalmente diferente que el observado en los individuos control. Lo anterior indica que existe un genotipo heterocigoto para este polimorfismo.

El análisis de los exones restantes 1, 5, 8, 10 y 12 para completar nuestro estudio molecular del gen Parkin y la secuenciación de los exones afectados reportados en el presente estudio, nos permitirá contar con más información sobre las mutaciones específicas para la población mexicana. El estudio de los factores genéticos probables asociados con nuestra población de pacientes con EP no fue el propósito fundamental del presente estudio, pero forma parte de nuestra línea de investigación, ya que se desconoce mucho acerca de la epidemiología de esta enfermedad neurodegenerativa que afecta las actividades de la vida diaria del paciente, además del gran impacto económico y social que produce al núcleo familiar.

Cabe señalar que los pacientes donde se identificaron mutaciones, corresponden a enfermos provenientes de la zona urbana. Trabajos recientes asocian la EP con contaminantes de hidrocarburo, ya que observaron que los pacientes con EP presentaban disminución en su capacidad para eliminarlos.¹⁹ Condiciones no evaluadas en el presente estudio.

Los hallazgos generados en el presente trabajo, apoyan la hipótesis de la participación de un factor genético como factor de predisposición en el desarrollo de la EP. Los polimorfismos encontrados en pacientes con EP idiopática no se encontraron en nuestro grupo de controles. El encontrar polimorfismos en exones 3 y 7 del gen Parkin en pacientes con EP idiopática, indica que las mutaciones en este gen no son exclusivas para EPJ-AR.

En conclusión, podemos establecer que los polimorfismos encontrados (22%) en pacientes con

EP permiten sugerir la asociación de esta enfermedad con un factor genético predisponente. La presencia de polimorfismos en el gen Parkin en pacientes mexicanos con EP mexicanos tiene un valor diagnóstico potencial, ya que existe una correlación mutación-enfermedad y finalmente los polimorfismos encontrados en pacientes con EP se pueden detectar en casos juveniles o idiopáticos.

REFERENCIAS

1. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 33.
2. Calne DB, Langston JW. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* 1983; p. 1457.
3. Jenner P, Schapira AHV, Marsden CD. New insights into the cause of Parkinson's disease. *Neurology* 1992; 42: 2241.
4. Sveinbjörnsdóttir S, Hicks A, Johnsson T, et al. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. *N Engl J Med* 2000; 343: 1765.
5. Lücking C, Dürr A, Bonifati V, et al. Association between early onset Parkinson's disease and mutations in the Parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 1560.
6. Maher NE, Golbe LI, Lazzarini AM, Mark MH, Currie LJ, Wooten GF, Saint-Hilaire M, Wilk JB, et al. Epidemiologic study of 203 sibling pairs with Parkinson's disease: the GenePD study. *Neurology* 2002; 58: 79.
7. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the Parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 608.
8. Abbas N, et al. A wide variety of mutations in the Parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 567.
9. Hedrich K, et al. Evaluation of 50 proband with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology* 2002; 58: 1239.
10. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsuyabashi S, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 588.
11. Leroy E, Boyer R, Auburger G, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395: 451.
12. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Susuki T. 2000. Familial Parkinson disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature Genet* 2000; 25: 302.
13. Shimura H, Schlossmacher Mg, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Scheider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ. Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by Parkin from human brain: implications for Parkinson disease. *Science* 2001; 293: 263.
14. West A, Periquet M, Lincoln S, Lücking C, Nicholl D, Bonifati V, Rawal N, Gasser T, Lohmann E, Deleuze JF, Maraganore D, Levey A, Wood N, Dürr A, Hardy J, Brice A, Farrer M. Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease. *A J Med Genet (Neurophsychiatric Genetics)* 2002; 114: 584.
15. West AB, Maraganore D, Crook J, Lesnick T, Lockhart PJ, Wilkes KM, Kapatoss G, Hardy JA, Farrer MJ. Functional association of the Parkin gene promoter with idiopathic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2787.
16. Maruyama M, Ikeuchi T, Saito M, Ishikawa A, Yuasa T, Tanaka H, Hayashi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Tsuji S. Novel mutations, pseudo-dominant inheritance, and possible familial affects in patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Ann Neurol* 2000; 50: 293.
17. Hilker R, Klein C, Hedrich K, Ozelius LJ, Vieregge P, Herholz K, Pramstaller PP, Heiss WD. The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the Parkin gene: evidence for enzymatic Parkin function in humans. *Neurosci Lett* 2002; 323: 50.
18. Taylor GR. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. New York: Ed. CRC Press; 1997, p. 79-107.
19. Canesi, et al. Poor metabolism of n-hexane in Parkinson's disease. *J Neurol* 2003; 250: 556.

