

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 748**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 31/137 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2017** **PCT/EP2017/064644**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2018** **WO18228692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2017** **E 17737488 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024** **EP 3638283**

54 Título: **Antagonistas de los canales de calcio tipo R Cav2.3 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.12.2024

73 Titular/es:

LARIO THERAPEUTICS LTD. (100.0%)
137a George Street
Edinburgh EH2 4JY, GB

72 Inventor/es:

LISS, BIRGIT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 992 748 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de los canales de calcio tipo R Cav2.3 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a los antagonistas del canal de calcio tipo R Cav2.3 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (PD) como se define en la presente reivindicación 1.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer. Solamente en Alemania hay aproximadamente 350,000 personas afectadas. Los principales síntomas motores son la alteración del control voluntario del movimiento, acompañado de rigidez muscular y temblor en reposo. En el mundo occidental, el número de pacientes con PD aumenta desde hace años. Este aumento no se debe únicamente a un aumento en la esperanza de vida. Por razones inexplicables, la edad a la que se manifiestan los síntomas motores está disminuyendo y, por lo tanto, más y más personas jóvenes padecen de la PD. La causa de este aumento en los casos de la PD sigue sin entenderse completamente, así como la causa de la enfermedad. Sin embargo, aunque la causa de la mayoría de los casos de la PD todavía no está clara, se han identificado como factores estresores de la PD diversos factores genéticos (genes PARK) y ambientales (como la disfunción de la mitocondria) que conducen al estrés metabólico.

20 Debe de enfatizarse que el estrés metabólico parece constituir un factor convergente común descendente esencial en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, si no es que en todas. Sin embargo, el aumento de la edad es el principal factor de riesgo de la PD, así como de la mayoría de las demás enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa más común).

25 Los síntomas motores de la PD están causados por una pérdida progresiva de dopamina en el estriado dorsal, debido a la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas (DA) del mesencéfalo, particularmente en la *Sustancia negra* (SN). Si esta muerte se pudiera detener o al menos reducir después del diagnóstico inicial, el proceso de la enfermedad y, por tanto, la progresión de los síntomas motores podría detenerse o ralentizarse. La terapia ideal específica del tipo celular de la PD debería intervenir de forma temprana en forma de neuroprotección, preferiblemente antes de que se desarrollen los síntomas motores clásicos de la PD, ya que normalmente el 70-80% de las neuronas DA de la SN ya se han perdido cuando se manifiestan los síntomas motores típicos de la PD. Cabe destacar que, además de las neuronas DA de la SN, una variedad de otras neuronas se ven afectadas por la degeneración en el curso de la PD, mientras que otras neuronas DA del mesencéfalo vecinas (como aquellas del área tegmental ventral, VTA), por una razón poco clara, son mucho más resistentes al estresor de la PD y a los procesos neurodegenerativos.

35 Esta denominada vulnerabilidad diferencial de las subpoblaciones neuronales no sólo está presente en la PD, sino en todas las enfermedades neurodegenerativas. Aunque sus causas subyacentes aún no están claras, se ha identificado que los altos niveles intrínsecos de estrés metabólico, en particular el estrés metabólico relacionado con los iones de calcio, es crucial para definir la vulnerabilidad de las neuronas a los estresores neurodegenerativos.

40 Sin embargo, las intervenciones terapéuticas de neuroprotección y de restauración dirigidas, sólo serían posibles si se comprendieran los patomecanismos moleculares subyacentes de la enfermedad. Dado que en la actualidad este no es el caso, no existe todavía ninguna terapia con la que se pueda curar a los pacientes con PD y tratarlos sintomáticamente y con una duración creciente de la enfermedad. Una terapia curativa de la PD ralentizaría o detendría la progresión de la enfermedad, o incluso prevendría la manifestación de los síntomas motores. Mientras que estas terapias son el objetivo de intensas investigaciones y ensayos clínicos en curso, las terapias establecidas actuales de la PD sólo son sintomáticas, dirigidas en particular a sustituir la pérdida de dopamina en el cerebro o retrasar su metabolismo (por ejemplo, mediante miméticos de dopamina como L-DOPA el precursor permisivo de dopamina de la barrera hematoencefálica, agonistas de los receptores de dopamina o inhibidores de la monoaminoxidasa, como MAO-B). Sin embargo, estas terapias tienen efectos secundarios considerables (por ejemplo, discinesia, alucinaciones y síndrome impulsivo/compulsivo ICB) que se van agravando a medida que pasa el tiempo del tratamiento.

55 Una terapia novedosa potencialmente neuroprotectora de la PD se encuentra actualmente en un ensayo clínico de fase III: se dirige a los canales de calcio activados por voltaje denominados tipo L (más concretamente a Cav1.3 o Cav1.2), y su inhibición farmacológica mediante fármacos, como la dihidropiridina DHP isradipina (*Parkinson Study Group, 2013, PMID: 24123224, phase III clinical trial ClinicalTrials.gov: NCT02168842*). Sin embargo, se han reportado resultados no concluyentes para la neuroprotección de DA de la SN en modelos de ratón con PD por neurotoxinas, para la inhibición farmacológica del canal de calcio tipo L (por isradipina) o para la ablación genética de Cav1.3 (*Ilijic et al., 2011 PMID: 21515375; Ortner et al., 2017, PMID: 28592699*).

En resumen, además de un colectivo muy limitado de pacientes para las opciones neuroquirúrgicas (estimulación cerebral profunda), en la actualidad sólo se han establecido terapias farmacológicas sintomáticas de la PD con miméticos de dopamina, que proporcionan una eficacia decreciente con efectos secundarios crecientes a lo largo del tiempo.

- 5 Los antagonistas de los canales de calcio tipo R Cav2.3 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson son conocidos de:

US 2012/321594 A1 (HONG KYONSOO [US] ET AL) 20 December 2012 (2012-12-20)

- 10 RODOLPHE HAJJ ET AL: "Combination of acamprosate and baclofen as a promising therapeutic approach for Parkinson's disease", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, no. 1, 6 November 2015 (2015-11-06), XP055445739, DOI: 10.1038/srep16084.

GEZA BERECKI ET AL: "Differential Ca v 2.1 and Ca v 2.3 channel inhibition by baclofen and [alpha]-conotoxin Vc1.1 via GABA B receptor activation",

JOURNAL OF GENERAL PHYSIOLOGY,

vol. 143, no. 4, 31 March 2014 (2014-03-31), pages 465-479, XP55445926, NEW YORK, US

- 15 ISSN: 0022-1295, DOI: 10.1085/jgp.201311104

US 2014/038927 A1 (COHEN DANIEL [FR] ET AL) 6 February 2014 (2014-02-06)

M. J. CANO-CEBRIAN ET AL: "Local acamprosate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors: an in vivo microdialysis study",

- 20 NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY vol. 367, no. 2, 1 February 2003 (2003-02-01), pages 119-125, XP055445779,

DE

ISSN: 0028-1298, DOI: 10.1007/s00210-002-0674-3

Komeili Gholamreza ET AL: "Effects of Isradipine on Induced-Parkinson's Disease in Rats",

Zahedan Journal of Research in Medical Sciences,

- 25 vol. en prensa, no. en prensa, 26 April 2016 (2016-04-26), XP55818555, DOI: 10.17795/zjrms-6444

ARIAS R L ET AL: "Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease",

NEUROBIOLOGY OF DISEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 31, no. 3, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 334-341, XP023905928,

ISSN: 0969-9961 , DOI: 10.1016/J.NBD.2008.05.008

- 30 [recuperado el 2008-07-07]

Gomez-Mancilla Baltazar ET AL: "Effect of ethosuximide on rest tremor in the MPTP monkey model: ETHOSUXIMIDE AND REST TREMOR",

MOVEMENT DISORDERS,

vol. 7, no. 2, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 137-141, XP55818897, US

- 35 ISSN: 0885-3185, DOI: 10.1002/mds.870070207

Schneider Toni ET AL: "How "Pharmacoresistant" is Cav2.3, the Major Component of Voltage-Gated R-type Ca2+ Channels?",

Pharmaceuticals,

vol. 6, no. 6, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 759-776, XP055805750, DOI: 10.3390/ph6060759

- 40 Recuperado de Internet:

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3816731/pdf/pharmaceuticals-06-00759.pdf>

Hainsworth Atticus H. ET AL: "Actions of sipatrigine, 202W92 and lamotrigine on R-type and T-type Ca²⁺ channel currents",

European Journal of Pharmacology,

vol. 467, no. 1-3, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 77-80, XP55818901, NL

5 ISSN: 0014-2999, DOI: 10.1016/S0014-2999(03)01625-X

JONES-HUMBLE 5 A ET AL: "The novel anticonvulsant lamotrigine prevents dopamine depletion in C57 black mice in the MPTP animal model of Parkinson's disease",

LIFE SCIENCE, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB,

vol. 54, no. 4, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 245-252, XP023748453,

10 ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/0024-3205(94)00813-2 [recuperado el 1994-01-01]

WO9415607 A (Rhone Poulenc Rorer SA, published on 21.07.1994

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un tratamiento y terapia mejorados y más eficaces para la enfermedad de Parkinson.

Sumario de la invención

15 La invención se refiere a un antagonista del canal de calcio tipo R Cav2.3 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en la que el antagonista es una construcción de CRISPR/Cas9, y en la que dicho antagonista inhibe parcial o totalmente la expresión funcional del gen de la subunidad alfa 1E del canal de calcio activado por voltaje (CACNA1E).

20 La vulnerabilidad diferencial de las distintas poblaciones neuronales al estresor neurodegenerativo es una característica distintiva de todas las enfermedades neurodegenerativas. El estrés metabólico elevado y la alteración de la homeostasis del calcio no solo son factores interdependientes, sino que también parecen proporcionar un acontecimiento descendente general convergente crucial en las enfermedades neurodegenerativas y la pérdida de neuronas dependiente de la edad (*Duda et al., 2016, PMID: 26865375*), y por lo tanto ofrecen dianas atractivas para intervenciones terapéuticas.

25 En la enfermedad de Parkinson (PD), las neuronas liberadoras de dopamina dentro de la *Sustancia negra* (DA de la SN) son particularmente vulnerables a los estresores de la PD y a la degeneración en comparación con otras neuronas dopaminérgicas vecinas. La pérdida progresiva, dependiente de la edad, de neuronas DA de la SN es un distintivo patológico de la PD, ya que la pérdida resultante de dopamina estriatal causa sus principales síntomas relacionados con el movimiento (tal como problemas con el control voluntario del movimiento, así como rigidez, temblor, acinesia e inestabilidad postural). Las neuronas DA de la SN liberan dopamina desde sus terminales axonales en el estriado dorsal, y también desde sus cuerpos celulares y de las dendritas en el mesencéfalo, dependientemente del calcio y de la actividad. Su actividad intrínsecamente generada y metabólicamente desafiante es creada y modulada por la función orquestada de diferentes canales iónicos y autorreceptores D2 de dopamina. Aunque la causa de la mayoría de los casos de PD no está clara y no se dispone de terapias curativas, la homeostasis del calcio (Ca²⁺) específica de las neuronas y el estrés metabólico se consideran factores importantes (*Schapira and Patel, 2014, PMID: 24664140; Duda et al., 2016, PMID: 26865375; Oertel and Schulz, 2016, PMID: 27577098; Singleton and Hardy, 2016, PMID: 27311081*).

40 Los canales de Ca²⁺ activados por voltaje (VGCCs), especialmente el Cav1.3 tipo L, han recibido una atención particular, ya que no sólo modulan el patrón de actividad y la liberación de dopamina de las neuronas DA de la SN, sino que también generan una carga de Ca²⁺ dendrítica estresora relacionada con la actividad que podría desencadenar neurodegeneración y PD (*Guzman et al., 2010, PMID: 21068725; Surmeier et al., 2017, PMID: 28104909*).

El inventor había demostrado previamente que los canales Cav1.3, además de estabilizar la actividad marcapasos generada intrínsecamente metabólicamente exigente de las neuronas DA de la SN, también pueden sensibilizar transitoriamente los autorreceptores de dopamina de tipo D2 (D2-AR) inhibidores en las neuronas DA de la SN que involucran al sensor de Ca²⁺ neuronal NCS-1, en un supuesto bucle de retroalimentación protectora. Este mecanismo de retroalimentación está mediado por LTCCs Cav1.3, sirviendo como una fuente de Ca²⁺ para NCS-1 en neuronas DA de la SN, apoyando su unión dependiente de Ca²⁺ a D2-ARs, y previniendo su desensibilización (*Dragicevic et al., PMID: 24934288*) y probablemente contrarresta los niveles elevados de estrés metabólico oscilatorio dependientes de la actividad y la muerte celular (*Guzman et al., 2010, PMID: 21068725*). Pero se observó sólo de forma transitoria en las neuronas DA de la SN de ratón en respuesta a niveles elevados de dopamina, por ejemplo, debido a la administración *in vivo* de L-DOPA (todavía el patrón de oro en la terapia de la PD). En resumen, los papeles fisiológicos de los LTCCs Cav1.3 en las neuronas DA de la SN parecen ser complejos y aún no están claros, y queda por demostrar en humanos

un efecto de neuroprotección causal de los bloqueadores de LTCC (como isradipina), mientras que su efecto en modelos de ratón de PD no es concluyente/es ambiguo. En resumen, hasta la fecha no se ha demostrado ningún efecto protector de los DHPs, en particular de la isradipina, en estudios prospectivos.

Por el contrario, los inventores han descubierto sorprendentemente que otro tipo de canal de calcio activado por voltaje, el canal tipo R o Cav2.3 (o el gen CACNALE, que codifica para todas las variantes de Cav2.3), contribuye significativamente a la alta vulnerabilidad de las neuronas DA de la SN a los estresores de la PD y a la degeneración. Por lo tanto, estos hallazgos desafían la visión actual sobre el papel de los VGCCs tipo L (Cav1.2/Cav1.3) como factor principal que contribuye a la alta vulnerabilidad de las neuronas DA de la SN a los estresores de la PD, y como dianas farmacológicas para la terapia de neuroprotección de la PD, así como la búsqueda continua de novedosos inhibidores específicos de los VGCCs tipo L Cav1.3 como nuevos fármacos de la PD (*Kang et al., 2012, PMID: 23093183; Orner et al., 2014, PMID: 24941892*).

El inventor demuestra que (i) la actividad de los canales Cav2.3 activados por voltaje es la fuente principal de oscilaciones de calcio relacionadas con la actividad somática en los cuerpos celulares de las neuronas DA de la SN de ratón, y no los VGCC tipo L Cav1.3 o Cav1.2 (*Orther et al., 2017, PMID: 28592699*), que (ii) la actividad de VGCC Cav2.3 estimula constitutivamente la señalización de NCS-1/D2-AR en las neuronas DA de la SN (como presunta respuesta compensatoria a las oscilaciones de calcio somáticas mediadas por Cav2.3 estresoras), y que (iii) la actividad de NCS-1 sí protege a las neuronas DA de la SN de la degeneración, y que (iv) las neuronas DA de la SN altamente vulnerables (y sus proyecciones axonales) están totalmente protegidas en un modelo de ratón de PD de neurotoxina crónica *in vivo* (MPTP/probenecida) en ratones KO Cav2.3, con ablación genética de Cav2.3 en todas las células. Mientras que las neuronas DA de la SN en un ratón KO NCS-1 muestran una mayor vulnerabilidad a los estresores degenerativos. Los datos de expresión genética y de células específicas en humanos complementan estos datos exhaustivos de modelos de ratón (véase los Ejemplos).

El descubrimiento de los inventores de Cav2.3 como el canal de calcio "estresor" en neuronas DA de la SN altamente vulnerables, que sin embargo no es regulado negativamente en neuronas DA de la SN en humanos en la PD, es apoyado por una regulación negativa de Cav2.3 en respuesta a un estresor de la PD (PARK1) en neuronas motoras vagas dorsales de ratón, ya que estas neuronas muestran un marcapasos basado en calcio estresor similar, pero por razones desconocidas son mucho más resistentes que las neuronas DA de la SN a la degeneración en la PD (*Goldberg et al., 2012 PMID: 22941107; Lasser-Katz et al., 2017, PMID: 28053029*).

Estos hallazgos del inventor llevan a la conclusión de que la modulación negativa de los canales Cav2.3 ofrece una vía terapéutica novedosa para la PD, y que esta intervención podría tener efectos de neuroprotección no sólo para las neuronas DA de la SN sino también para otras neuronas altamente vulnerables en la PD.

Específicamente, la administración preventiva o la administración después de un diagnóstico temprano de PD, de sustancias adecuadas (es decir, antagonistas) que inhiben la actividad funcional de los canales de calcio Cav2.3 o su expresión funcional, produce una ralentización o una detención de la pérdida progresiva de las neuronas DA de la SN. Dichas sustancias adecuadas de acuerdo con la presente invención se refieren a antagonistas de los canales de calcio tipo R Cav2.3.

El término "modular" o "modulación" de acuerdo con la invención significa una modulación negativa y debe entenderse como la inhibición o impedimento parcial o total, por ejemplo, la regulación negativa de la expresión funcional del gen de la subunidad alfa 1E del canal de calcio activado por voltaje (CACNA1E).

El término "reducir" la actividad de un canal de calcio tipo R Cav2.3 significa que la actividad funcional es menor que bajo condiciones normales, es decir, sin ninguna modulación del canal de calcio tipo R Cav2.3. La actividad puede ser total o parcialmente inhibida o bloqueada o interferida.

Cualquier grado en el que se reduzca la actividad funcional o la expresión funcional del canal de calcio tipo R Cav2.3 significa una modulación de acuerdo con la invención.

Preferiblemente, la actividad funcional se reduce hasta 10%, preferiblemente hasta 30%, más preferiblemente hasta 50%, aún más preferiblemente hasta 70% y lo más preferiblemente hasta 100% en comparación con la actividad normal del canal de calcio tipo R Cav2.3.

El término "regulación negativa / regulando negativamente" significa que la expresión funcional se produce en menor medida que bajo condiciones normales, es decir, sin ninguna modulación del canal de calcio tipo R Cav2.3. La expresión puede ser total o parcialmente inhibida o bloqueada o interferida.

Cualquier grado en el que se regule negativamente la expresión del canal de calcio tipo R Cav2.3 significa una modulación de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la expresión se regula negativamente hasta 10%, preferiblemente hasta 30%, más preferiblemente hasta 50%, aún más preferiblemente hasta 70% y lo más preferiblemente hasta 100% en comparación con la actividad normal del canal de calcio tipo R Cav2.3.

Las construcciones de Crispr/Cas9 de acuerdo con la invención producen regulación negativa, modulación o prevención de la expresión.

5 El término "tratamiento" se refiere a un tratamiento terapéutico, a medidas profilácticas o preventivas, a la protección de neuronas y al aplazamiento de la aparición de la enfermedad, en el que el objetivo es retrasar, prevenir o ralentizar la afección o el trastorno patológico diana. Los sujetos que necesitan un tratamiento incluyen a aquellos que ya presentan indicadores del trastorno o trastornos, así como a aquellos propensos a desarrollar estos trastornos.

Los sujetos de la presente invención son preferiblemente mamíferos, más preferiblemente humanos.

10 El término "enfermedades neurodegenerativas" de acuerdo con la divulgación se refiere a enfermedades con pérdida progresiva de la estructura y/o función de las neuronas, incluyendo la muerte patológica (es decir, degeneración) de las neuronas, en particular, pero no limitado a la degeneración preferencial de las neuronas DA de la SN en la PD y durante el envejecimiento.

En otra realización, la invención se refiere al antagonista del canal de calcio tipo R Cav2.3,

15 en el que el antagonista se utiliza en combinación con miméticos de dopamina (que deben de entenderse como todas las sustancias que regulan/modulan el metabolismo de dopamina), tal como L-DOPA y los agonistas de los receptores de dopamina y/o los inhibidores de la monoaminoxidasa (inhibidores de la MAO). La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista del canal de calcio tipo R Cav2.3 como se define en la presente reivindicación 1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o al menos un portador.

20 El término "excipientes farmacéuticamente aceptables" se refiere a excipientes que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro tipo cuando se administran a un animal, preferiblemente a un humano. Incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. Para administración en humanos, las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza.

25 Tales excipientes farmacéuticamente aceptables son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Los ejemplos de tales excipientes incluyen intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tal como albúmina de suero humano, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos tales como sulfato de protamina, hidrogeno fosfato disódico, hidrogeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisalicilato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, y polietilenglicol. Los excipientes para las formas tópicas o basadas en gel del antagonista incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa de sodio o metilcelulosa, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, polímeros en bloque de polioxietileno polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones se utilizan adecuadamente formularios de depósito convencionales.

30

35 Tales formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nano cápsulas, liposomas, comprimidos sublinguales y preparaciones de liberación sostenida.

La composición farmacéutica se puede administrar por diversas vías de administración. Los ejemplos de vías de administración adaptadas incluyen, pero no se limitan a, administración intramuscular (i.m.), subcutánea, intravenosa, intraocular, transdérmica, tópica, parenteral, intranasal y oral. La administración parenteral puede ser por inyección intravenosa (IV), inyección subcutánea (s.c.), inyección intramuscular (i.m.), inyección intraarterial, inyección intratecal (i.t.), inyección intraperitoneal (i.p.), o inyección directa u otra administración al sujeto. Las vías de administración preferibles son oral y parenteral.

40

La composición farmacéutica se puede diseñar para ser de acción corta, de liberación rápida, de acción prolongada o de liberación sostenida, tal como se describe en la presente. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas también se pueden formular para liberación controlada o para liberación lenta.

45

La composición farmacéutica comprende preferiblemente un sistema de administración que controla la liberación de la composición. Los ejemplos de portadores adecuados para la liberación sostenida o retardada incluyen, pero no se limitan a, gelatina, goma arábiga, polímeros de xantano, resinas termoplásticas tales como, por ejemplo, haluros de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilideno y poliolefinas halogenadas, elastómeros tales como, por ejemplo, brasiliensis, polidienos y gomas naturales y sintéticas halogenadas, y resinas termoestables flexibles tales como poliuretanos, resinas epoxi, polímeros biodegradables y similares.

50

La barrera hematoencefálica (BBB) es una barrera física y un sistema de mecanismos de transporte celular entre los vasos sanguíneos en el sistema nervioso central (CNS) y la mayoría de las zonas del propio CNS. La BBB mantiene la homeostasis al restringir la entrada de sustancias químicas potencialmente nocivas procedentes de la sangre y permitiendo la entrada de nutrientes esenciales. Sin embargo, la BBB puede suponer una barrera para la administración de agentes farmacológicos al CNS para el tratamiento de trastornos. La composición farmacéutica se puede utilizar preferiblemente junto con sistemas de administración que

55

faciliten la administración de los agentes al sistema nervioso central. Por ejemplo, se pueden utilizar diversos potenciadores de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) para aumentar de forma transitoria y reversible la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a un agente de tratamiento. Dichos potenciadores de la permeabilidad de la BBB incluyen, pero no se limitan a, leucotrienos, agonistas de la bradiquinina, histamina, disruptores de la unión estrecha (por ejemplo, zonulina, zot), soluciones hiperosmóticas (por ejemplo, manitol), agentes contractivos del citoesqueleto y alquilglicerol de cadena corta (por ejemplo, 1-O-pentilglicerol). Las vías oral, sublingual, parenteral, de implantación, nasal y de inhalación pueden proporcionar la administración del agente activo al sistema nervioso central. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención se pueden administrar al sistema nervioso central con efectos mínimos en el sistema nervioso periférico.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la dosis adecuada del antagonista dependerá de la gravedad y el curso de la enfermedad, si los antagonistas se administran con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al antagonista, y la discreción del médico tratante. El antagonista se administra adecuadamente al paciente de una sola vez o en una serie de tratamientos.

En una realización de la composición farmacéutica, el antagonista se utiliza en combinación con miméticos de dopamina (que deben de entenderse como todas las sustancias que regulan/modulan el metabolismo de la dopamina), como L-DOPA y los agonistas de los receptores de dopamina y/o los inhibidores de la monoaminoxidasa (inhibidores de la MAO).

Una "muestra biológica" de acuerdo con la presente invención se refiere a tejido, células primarias, líneas celulares que expresan endógenamente el canal iónico Cav2.3 o líneas celulares transfectadas o estimuladas de forma transitoria o estable para expresar el canal iónico Cav2.3 o cualquier fracción del mismo. En estas muestras biológicas, la actividad de los canales Cav2.3 se puede investigar mediante técnicas biofísicas (por ejemplo, pero sin limitarse a métodos electrofisiológicos, de conductancia, impedancia o espectrales), mediante desplazamiento radiométrico o de fluorescencia, o mediante señales relacionadas con una actividad del canal Cav2.3 como, por ejemplo, pero sin limitarse al potencial de membrana, conductancia, o cambios de calcio u otros portadores de carga detectados por métodos ópticos, biofísicos, eléctricos o analíticos.

Los métodos de acuerdo con la invención se pueden realizar como se describe en McManus OB (2014) HTS assays for developing the molecular pharmacology of ion channels. Curr Opin Pharmacol. 15:91-96. Y en Hai-bo YU, Min LI, Wei-ping WANG, Xiao-liang WANG (2016) High throughput screening technologies for ion Channels, Acta Pharmacologica Sinica 37: 34-43

La medición de la inhibición del canal de calcio tipo R Cav2.3 se puede realizar además utilizando métodos estándar electrofisiológicos, analíticos, biofísicos, de unión, de fluorescencia o de luminiscencia como se describe en el Assay Guidance Manual, según la actualización del 31 de marzo de 2017 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100915/>). Este incluye métodos para:

- evaluar las corrientes (por ejemplo, métodos electrofisiológicos, de fijación en parche o de impedancia);
- el cambio de las concentraciones de iones o las diferencias de carga entre dos compartimentos (incluyendo, pero no limitado a, soluciones intracelulares y extracelulares) utilizando calcio u otro portador de carga adecuado (por ejemplo, pero no limitado a bario) ya sea etiquetado o sin etiquetar. La lectura puede realizarse mediante fluorescencia, luminiscencia, sensores de voltaje unidos a la membrana o métodos analíticos;
- el desplazamiento de agentes etiquetados (por ejemplo, agentes etiquetados con radio o fluorescencia que tienen afinidad por el canal o por alguno de sus sitios moduladores).

Descripción breve de las figuras

Figuras

La Figura 1 demuestra que la autoinhibición de dopamina sensibilizada en neuronas maduras DA de la SN está mediada por Cav2.3, Ca^{2+} y la interacción de NCS-1/D2-AR. a, Actividad de neurona DA de la SN registrada a partir de cortes de cerebro *in vitro* en parche perforado (inserto). Aplicación del baño de dopamina (100 μM) según se indica. b-f, Frecuencias normalizadas graficadas en el tiempo para todas las neuronas DA de la SN analizadas (conjunto de datos en b parcialmente de Dragicevic et al., 2014, PMID: 24934288. Aplicación de isradipina (300 nM), SNX-482 (100 nM) y cepa de ratón según se indica (WT, KO NCS-1, KO Cav2.3). g, Actividad relativa de neuronas DA de la SN (de Fig. 1b-f, y Fig. 5 a-i) en el último minuto en dopamina. h, Los resultados de UV-LMD y RT-qPCR para Cav2.3, Cav1.2, Cav1.3, sensor neuronal de Ca^{2+} NCS-1, y para autoreceptores de dopamina (variantes de empalme cortas y largas de D2s/D2l) en neuronas DA de la SN de ratón juvenil y adulto. Imágenes superiores: sección de cerebro de ratón juvenil antes y después de UV-LMD. Barras de escala: 250 μm / 10 μm . Imágenes inferiores: Lugar de inyección estriatal de un cerebro de ratón adulto trazado retrógradamente, alineado con el atlas del cerebro de ratón y neurona DA de la SN etiquetada.

Barras de escala: 10 μm . Datos detallados en las Tablas Suplementarias S4, S5, S7A (Figs. 11, 12, 14). Barras de error: SEM.

La Figura 2 muestra que las oscilaciones de Ca^{2+} relacionadas con la actividad somática en las neuronas DA de la SN están mediadas en gran medida por los canales Cav2.3. Las neuronas se registraron en la configuración de fijación en parche perforado mientras se obtenían imágenes simultáneas de la dinámica de Ca^{2+} somática (inserto a). a-c, Izquierda: Registros de una neurona DA de la SN WT (a), una neurona DA de la SN KO Cav2.3 (b), y una neurona DA del VTA WT (c). Los registros continuos ilustran el disparo del potencial de acción (AP) y las oscilaciones de Ca^{2+} asociadas. Derecha: Media de 20 APs y oscilaciones medias de Ca^{2+} asociadas para las neuronas de la izquierda. Los rastros individuales se superponen en gris. d, Izquierda: Pico promedio y transitorio de Ca^{2+} de todas las neuronas DA de la SN WT analizadas ($n=8$; rastro negro) y DA de la SN KO Cav2.3 ($n=9$; rastro azul), y mesolímbicas DA del VTA WT ($n=7$; rastro rojo). Derecha: Resumen de diagramas de caja que muestran las amplitudes máximas de las oscilaciones de Ca^{2+} relacionadas con el pico de todas las neuronas analizadas. e, Izquierda: Transientes relacionados con la actividad de Ca^{2+} inducidos por voltaje (inserto) de una neurona DA de la SN WT en ausencia (rastro negro) y presencia (rastro rojo) de 100 nM de SNX-482. Derecha: Señales relativas de Ca^{2+} de todas las neuronas DA de la SN analizadas en ausencia y presencia de SNX-482 y señal relativa restante de Ca^{2+} en SNX-482. Cajas: percentiles 25 y 75, Bigotes: percentiles 10 y 90. Todos los datos detallados en la Tabla Suplementaria S6A/B (Fig. 13).

La Figura 3 demuestra una mayor vulnerabilidad de las neuronas DA de la SN en KO NCS-1, y una protección completa y selectiva de las neuronas DA de la SN en ratones KO Cav2.3 en un modelo de ratón de PD (MPTP). a/c, Izquierda: Inmunotinción de TH de secciones estriales de ratones WT, KO NCS-1 y KO Cav2.3 tratados repetidamente con MPTP/probenecida o salina como controles, según se indica. Mitad: Cuantificación de la densidad óptica de la señal de TH en el estriado dorsal (DS) y el estriado ventral (VS), y señal de TH restante relativa en ratones MPTP. Barras de error: SD. Derecha: Intensidades medias para todas las secciones analizadas para todos los animales. Barras de error: SEM. b/d, Izquierda: Inmunotinción de TH de secciones coronales del mesencéfalo de ratones WT, KO NCS-1 y KO Cav2.3 tratados repetidamente con MPTP/probenecida o salina, según se indica. Mitad: Cuantificación estereológica de las neuronas DA de la SN y DA del VTA, y neuronas restantes relativas en ratones MPTP. Barras de error: SD. Derecha: Número medio absoluto de neuronas DA de la SN contadas para todas las secciones analizadas de todos los animales. Barras de error: SEM. Los valores de los datos y el análisis de bootstrap adicional se detallan en la Tabla Suplementaria S8B/C/D (Fig. 15) y en la Fig. 6.

La figura 4 muestra el análisis específico de células de las neuronas DA de la SN en ratones KO NCS-1 y en cerebros humanos *post mortem*. a, UV-LMD y RT-qPCR de Cav2.3 en neuronas DA de la SN de ratones WT y KO NCS-1 jóvenes y envejecidos (1.5 años). Barras de error: SEM. b, Izquierda: Secciones del mesencéfalo teñidas con tirosina hidroxilasa de ratones WT y KO NCS-1 juveniles (PN13). Superior derecha: Cuantificación estereológica del número de neuronas DA de la SN en ratones WT y KO NCS-1 a cuatro edades diferentes. Barras de error: SD. Inferior derecha: Números absolutos medios de neuronas DA de la SN contadas para todas las secciones analizadas para todos los animales (en PN13). Barras de error: SEM. c, Fotografías: Neuronas DA de la SN de humano positivas para neuromelanina procedentes de secciones cerebrales *post mortem* antes y después de UV-LMD. De izquierda a derecha: Cuantificación por RT-qPCR de las proporciones de ARNm de NCS-1/Cav2.3 y ARNm de NADH deshidrogenasa ND1 (codificada por ADN mitocondrial), así como cuantificación por qPCR de los niveles de ADN genómico de ND1, y de las proporciones genómicas de ND4/ND1 como se midieron para la integridad del ADN mitocondrial (en relación con el ADN mitocondrial totalmente intacto de muestras de sangre humana frescas) para neuronas DA de la SN de humano procedentes de cerebros de pacientes con PD y de controles sanos adultos y envejecidos. d, Izquierda: Representación topológica de las mutaciones sin sentido *de novo* (puntos coloreados) identificadas en pacientes con NDD/ID con respecto a la localización de los exones faltantes (estrellas coloreadas) en CACNA1E (codificando todas las variantes de empalme Cav2.3 a-e). Derecha: Combinación del uso del exón en las seis variantes de empalme Cav2.3 conocidas, en negritas la variante detectada en neuronas DA de la SN individuales. Todas las barras de error: SEM. Todos los datos detallados en las Tablas Suplementarias S7B/C, S8A (Figs. 14, 15).

La Figura 5 muestra que la autoinhibición de dopamina sensibilizada en neuronas maduras DA de la SN está mediada por Cav2.3, Ca^{2+} y la interacción de NCS-1/D2-AR. a-i, Experimentos como en la Fig. 1. Frecuencias normalizadas graficadas en el tiempo para todas las neuronas DA de la SN analizadas. Aplicación del baño de dopamina (100 μM) según se indica. Aplicación de EGTA (0.1 mM, célula entera), isradipina (300 nM), Z941 (10 μM), SNX-482 (100 nM), MVIIC (1 μM) y cepa de ratón según se indica (WT, KO NCS-1, KO Cav2.3). j, Actividad relativa de las neuronas DA de la SN (de la Fig. E1a-i) en el último minuto en dopamina. h, Resultados de UV-LMD y RT-qPCR para Cav2.3, Cav1.2, Cav1.3, sensor neuronal de Ca^{2+} NCS-1, y para autoreceptores de dopamina (variantes de empalme cortas y largas de D2s/D2l) en neuronas DA de la SN de ratón juvenil y adulto. Fotografías superiores: sección del cerebro de ratón juvenil antes y después de UV-LMD. Barras de escala: 250 μm / 10 μm . Fotografías inferiores: Lugar de inyección estriatal de un cerebro de ratón adulto trazado retrógradamente, alineado con el atlas del cerebro de ratón y neurona DA de la SN etiquetada. Barras de escala: 10 μm . Datos detallados en las Tablas Suplementarias S4, S5, S7A (Figs. 11, 12, 14). Cajas: percentiles 25 y 75, Bigotes: percentiles 10 y 90.

La Figura 6 muestra una mayor vulnerabilidad de las neuronas DA de la SN en KO NCS-1, y una protección completa y selectiva de las neuronas DA de la SN en ratones KO Cav2.3 en un modelo de ratón de PD (MPTP). a/c, Izquierda: Cuantificación de la densidad óptica de la señal de TH en el estriado dorsal (DS) y el estriado ventral (VS) en ratones WT, KO NCS-1 y KO Cav2.3 en salina y tratados con MPTP. Barras de error: SD. Mitad: señales de TH medias relativas restantes en DS y VS en animales tratados con MPTP, con respecto a las señales medias de los respectivos grupos de animales tratados con salina, sin y con aproximación de análisis de bootstrap. Barras de error: SD. Derecha: Número medio absoluto de neuronas DA de la SN contadas para todas las secciones analizadas de todos los animales. Barras de error: SEM. b/d, Izquierda: Cuantificación estereológica de las neuronas DA de la SN y DA del VTA en ratones WT, KO NCS-1 y KO Cav2.3 en salina y tratados con MPTP. Barras de error: SD. Mitad: número medio relativo restante de neuronas DA de la SN y DA del VTA en animales tratados con MPTP, con respecto a las señales medias de los respectivos grupos de animales tratados con salina, sin y con aproximación de análisis de bootstrap. Barras de error: SD. Derecha: Número medio absoluto de neuronas DA del VTA contadas para todas las secciones analizadas de todos los animales. Barras de error: SEM. Todos los datos se detallan en la Tabla Suplementaria S8B/C/D (Fig. 15).

La figura 7 muestra el análisis específico de células de las neuronas DA de la SN en ratones KO NCS-1 y de cerebros humanos *post mortem*. a, UV-LMD y RT-qPCR de Cav2.3 en neuronas DA de la SN de ratones WT y KO NCS-1 jóvenes y envejecidos (1.5 años). b, Izquierda: Secciones del mesencéfalo teñidas con tirosina hidroxilasa de ratones WT y KO NCS-1 juveniles (PN13). Derecha superior: Cuantificación estereológica del número de neuronas DA de la SN en ratones WT y KO NCS-1 a cuatro edades diferentes. Derecha inferior: Números absolutos medios de neuronas DA de la SN contadas para todas las secciones analizadas para todos los animales (en PN13). c, Fotografías: Neuronas DA de la SN de humano positivas para neuromelanina procedentes de secciones cerebrales *post mortem* antes y después de UV-LMD. De izquierda a derecha: Cuantificación por RT-qPCR de las proporciones de ARNm de NCS-1/Cav2.3 y ARNm de ND1 de NADH deshidrogenasa (codificado por ADN mitocondrial), así como cuantificación por qPCR de los niveles de ADN genómico de ND1, y de las proporciones genómicas de ND4/ND1 como se midieron para la integridad del ADN mitocondrial (en relación con el ADN mitocondrial totalmente intacto de muestras de sangre humana frescas) para neuronas DA de la SN de humano procedentes de cerebros de pacientes con PD y de controles sanos adultos y envejecidos. d, Superior izquierda: Representación topológica de las mutaciones sin sentido *de novo* (puntos coloreados) identificadas en pacientes con NDD/ID con respecto a la localización de los exones faltantes (estrellas coloreadas) en CACNA1E (codificando todas las variantes de empalme Cav2.3 a-e). Derecha superior: Combinación del uso del exón en las seis variantes de empalme Cav2.3 conocidas, en negritas variante detectada en neuronas DA de la SN individuales. Inferior: El alineamiento múltiple de secuencias de proteínas muestra la alta conservación de todos los residuos mutados excepto uno (I283N) en Cav2.3 en comparación con otras proteínas Cav1/Cav2 humanas (aminoácidos idénticos mostrados como puntos). La localización relativa de los dominios transmembranales o de la región del poro se representa mediante recuadros azules. Los residuos positivos altamente conservados de uno de los dominios S4 de CACNA1E implicados en la detección de voltaje se muestran con fondo gris (alineamiento superior izquierdo). Cajas: percentiles 25 y 75, Bigotes: percentiles 10 y 90. Todos los datos detallados en las Tablas Suplementarias S7B/C, S8A (Figs. 14, 15).

La Figura 8 muestra la Tabla Suplementaria S1 que representa los detalles de los cebadores de PCR multiplex (externo) y de PCR anidado (interno).

La Figura 9 muestra la Tabla Suplementaria S2 que representa los detalles de los ensayos de qPCR con TaqMan y la información de la curva estándar. Todas las sondas están etiquetadas con 5'-FAM (6-carboxifluoresceína) y 3'-NFQ (extintor no fluorescente). P: sonda, F: cebador delantero, R: cebador reverso; m: ratón, h: humano; pb: tamaño del amplicón; EB: límite del exón abarcado; T: umbral para análisis; Y: Intercepto Y de la curva estándar. Y, pendiente y R^2 expresado como media \pm SEM.

La Figura 10 muestra la Tabla Suplementaria S3 que representa los detalles de los mesencéfalos humanos *post mortem* analizados. Abreviaciones: CERAD: Consorcio para establecer un registro para la enfermedad de Alzheimer; PMI: intervalo en horas post mortem, RIN: Número de integridad del ARN; PD: Enfermedad de Parkinson; EA: Enfermedad de Alzheimer; + *utilizado para la cuantificación del ARNm de ND1*; ~*utilizado para la cuantificación del ARNm de NCS-1 y Cav2.3*, #*utilizado para la cuantificación del ADN genómico mitocondrial de ND1 y ND4*.

La Figura 11 muestra la Tabla Suplementaria S4 que representa la actividad *in vitro* de las neuronas DA de la SN en el último minuto en dopamina. Los datos y las estadísticas para las gráficas mostradas en la Fig. 1b-g y la Fig. 5a-j se expresan como media, \pm SD, \pm SEM, mediana e intervalo de confianza (CI) del 95%. Los parámetros se obtuvieron a partir de registros perforados/unidos a células, si no están marcadas con* para registros de células completas. n representa el número de neuronas DA de la SN analizadas. Las significancias de acuerdo con las pruebas U de Mann-Whitney (MWU) (valores significativos en negritas). *Conjunto de datos extraídos en parte de (Dragicevic et al., 2014, PMID: 24934288).

La Figura 12 muestra la Tabla Suplementaria S5 que representa los parámetros de marcapasos *in vitro* de las neuronas DA de la SN. Los datos se expresan como media, \pm SD, \pm SEM, mediana e intervalo de confianza (IC)

del 95% para la frecuencia del marcapasos basal y la precisión del marcapasos (expresada como coeficiente de variación del intervalo entre picos, CV ISI, así como valores CV2). n representa el número de neuronas DA de la SN analizadas. Significancia de acuerdo con la prueba MWU (valores significativos en negritas).

La Figura 13 muestra la Tabla Suplementaria S6 A/B que representa la obtención de imágenes de calcio en las neuronas DA de la SN y VTA. Los datos y las estadísticas de las gráficas que se muestran en las Figs. 2a-c (A) y 2d (B) expresados como media, \pm SD, \pm SEM, mediana e intervalo de confianza (CI) del 95%. n representa el número de neuronas DA analizadas. Significancias de acuerdo con MWU *no pareado (A) y #pareado (B) (valores significativos en negritas).

La Figura 14 muestra la Tabla Suplementaria S7 A/B/C que representa los datos de qPCR de células individuales de neuronas DA de la SN de humanos y de ratón. Los datos de RT-qPCR y las estadísticas de los genes como se indica en las gráficas mostradas en la Fig. 1h (A), Fig. 4a (B) y Fig. 4c (C) dado como media, \pm SD, \pm SEM, mediana e intervalo de confianza (CI) del 95%. n representa el número de muestras DA de la SN analizadas. Significancias de acuerdo con las pruebas *MWU- o #Kruskal-Wallis (valores significativos en negritas). Si la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas, se indican los valores p individuales de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Para el ARNm de ND1: adulto versus envejecido, $p = <0.0001$; adulto versus PD, $p = 0.0009$; envejecido versus PD, $p = >0.9999$. Para hND4/hND1: sangre versus adulto, $p = 0.0172$; sangre versus envejecido, $p = 0.2999$; sangre versus PD, $p = 0.0314$.

La Figura 15 muestra la Tabla Suplementaria S8 A/B/C/D que representa los datos de estereología y densitometría.

Los datos y las estadísticas de las gráficas mostrados en la Fig. 4b (A), Fig. 3 (B,C) y Fig. 6 (D) dado como media, \pm SD, \pm SEM, mediana e intervalo de confianza (CI) del 95%. n representa el número de ratones analizados (excepto para D). Significancia de acuerdo con *MWU- o #prueba de Kruskal-Wallis "con prueba de Dunn no corregida (valores significativos en negritas). La *prueba T sólo se utilizó para las fibras y neuronas restantes relativas sin análisis de bootstrap (véase la Tabla Suplementaria S8C). Se calculó la pérdida relativa de las señales de TH (%) en el estriado dorsal (DS) y ventral (VS) y la pérdida relativa de neuronas DA de la SN y DA del VTA, además de la normalización a los valores medios respectivos del grupo tratado con salina (véase Tabla Suplementaria S8C) como aproximación de bootstrap (véase Tabla Suplementaria S8D y métodos para más detalles).

La Figura 16 muestra la Tabla Suplementaria S9 que representa las mutaciones *de novo* en el sitio de empalme y sin sentido en CACNA1E identificadas en pacientes con trastornos del neurodesarrollo (NDD) y discapacidad intelectual (ID). Dos mutaciones alteran los sitios de empalme invariantes del intrón 11 y el intrón 35, lo que se predice que interfiere gravemente con el empalme y probablemente conduzca a la omisión del exón. Se predice que esto resulte en un cambio de marco consecutivo y a un codón de paro prematuro, en el primer caso y en una delección dentro del marco de 22 aminoácidos (incluidos 18 residuos altamente conservados del dominio transmembranal IVS5) en el segundo caso, de modo que ambas alteraciones del sitio de empalme representan muy probablemente alelos LoF. Las seis mutaciones de novo son alteraciones sin sentido localizadas en diferentes partes de la proteína Cav2.3.

La Figura 17 ilustra como conclusión de la invención los roles funcionales bidireccionales de Cav2.3 en las neuronas DA de la SN que se desequilibran debido a desencadenantes neurodegenerativos adicionales (estresores de la PD como el envejecimiento, genes PARK, factores ambientales).

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con la invención, se ha demostrado que mediante la combinación de registros de fijación en parche de cortes de cerebro con obtención de imágenes de Ca^{2+} , herramientas farmacológicas y genéticas, así como mediante análisis moleculares y biológicos específicos de células de neuronas DA de la SN de ratón y de humano, que un tipo de VGCCs, los llamados canales de Ca^{2+} tipo R Cav2.3, *estimulan persistentemente* la unión de NCS-1 a D2-ARs en neuronas maduras DA de la SN de ratones adultos, y por lo tanto sensibilizan constantemente sus respuestas inhibitorias autorreceptoras de dopamina D2-AR (Fig. 1, Fig.5). En la presencia del bloqueador del canal Cav2.3 SNX-482 y en un ratón inactivado (KO) en Cav2.3, la mayoría de las neuronas adultas DA de la SN mostraron ahora respuestas D2-AR desensibilizadas, normalmente sólo encontradas en las de ratones más jóvenes (Fig. 1e-g). El amortiguar el Ca^{2+} interno (0.1 mM de EGTA), utilizando un péptido que bloquea la unión de NCS-1 a D2-AR, y la eliminación de NCS-1 tuvieron efectos similares sobre las respuestas maduras de D2-AR que la inhibición o pérdida de Cav2.3 (Fig. 1c, g, Fig. 5b, f). Por el contrario, el bloqueador de LTCC isradipina (300nM) VGCCs tipo P/Q (1 μM de ω -conotoxina MVIIIC) y tipo T (10 μM de Z941) no alteró sustancialmente la autoinhibición de dopamina sensibilizada de las neuronas DA de la SN (Fig. 1d, g, Fig.5e, g). Esto confirma que el acoplamiento funcional de Cav2.3, NCS-1 y la señalización D2-AR es crucial para mantener constantemente sensibilizadas las respuestas inhibitorias a dopamina en las neuronas maduras DA de la SN. Consistente con un papel prominente de los canales Cav2.3 en las neuronas DA de la SN, los resultados de la RT-qPCR cuantitativa específica de las células de los inventores (Fig. 1h, Fig. 4d, Fig. 5j-m) muestran que Cav2.3 (más precisamente la variante de empalme Cav2.3e) es la principal isoforma VGCC

en las neuronas DA de la SN de ratones adultos; los niveles de ARNm de Cav2.3e (así como los de D2-AR, variantes de empalme cortas y largas) aumentan con la maduración postnatal, mientras que los de LTCCs Cav1.3 y Cav1.2 disminuyen. Esto está en línea con una reducción respectiva dependiente de la edad de las corrientes LTCC y de la contribución de Cav1.3 para la sensibilización de D2 AR en neuronas DA de la SN juveniles, pero no adultas (*Branch et al., 2016 PMID: 27053209*). Las respuestas de D2-AR sensibilizadas inhiben la actividad de marcapasos (y el estrés metabólico asociado) en mayor medida, y su dependencia de Cav2.3 apunta a un bucle de retroalimentación inhibitorio protector, ya que la actividad de Cav2.3 también podría contribuir a la entrada de Ca²⁺ dependiente de la actividad y, por tanto, a la actividad estresora, la carga de Ca²⁺ y una alta carga metabólica en las neuronas DA de la SN adultas.

Para demostrar directamente que Cav2.3 contribuye significativamente a la dinámica de Ca²⁺ somática dependiente de voltaje durante la actividad de marcapasos (*Guzman et al., 2010, PMID: 21068725*), se combinó la electrofisiología de cortes cerebrales con la obtención de imágenes ratiométricas de Ca²⁺ (Fig. 2). De hecho, las oscilaciones de Ca²⁺ relacionadas con la actividad somática en las neuronas DA de la SN estaban en gran medida mediadas por Cav2.3. Las oscilaciones de Ca²⁺ dependientes de la actividad somática se redujeron drásticamente en el cuerpo celular / soma de las neuronas DA de la SN de ratones adultos KO Cav2.3 durante la actividad espontánea (Fig. 2a-c), mientras que no se vieron afectadas significativamente en el cuerpo celular de las neuronas DA de la SN WT en presencia del inhibidor de LTCC isradipina (*Ortner et al., 2017, PMID: 28592699*). Además, en las neuronas DA de la SN de ratones WT, en presencia del inhibidor de Cav2.3 SNX-482, los transientes de Ca²⁺ somáticos inducidos por el potencial de acción también se redujeron significativamente (Fig. 2d), mientras que las neuronas DA del VTA mesolímbicas más resistentes de WT casi no mostraron oscilaciones somáticas de Ca²⁺ (Fig. 2c, f. y tabla Suplementaria S6 / Figura 13).

Estos datos indican funciones bidireccionales de Cav2.3 en las neuronas DA de la SN: (i) afluencia de Ca²⁺ dependiente de la actividad, causando potencialmente un elevado estrés metabólico como se ha demostrado para los canales tipo L (*Guzman et al., 2010, PMID: 21068725*), y (ii) estimulación por retroalimentación de la actividad inhibitoria de NCS-1/D2-AR, reduciendo el estrés metabólico relacionado con la actividad, y probablemente protegiendo a las neuronas DA de la SN de la sobrecarga de Ca²⁺ y la degeneración (*Duda et al., 2016, PMID: 26865375*). Esta hipótesis predice que la alteración de este delicado equilibrio mediante la reducción de la expresión de NCS-1 debería aumentar la vulnerabilidad de las neuronas DA de la SN a los estresores de la PD, mientras que la reducción de la expresión de Cav2.3 debería tener el efecto contrario.

Para confirmar su hipótesis, el inventor aplicó un modelo de PD de neurotoxina crónica (MPTP/probenecida) a ratones KO NCS-1, KO Cav2.3 y WT, y comparó el patrón y el grado de pérdida inducida de neuronas DA en el estriado y en el mesencéfalo mediante tinción con tirosina hidroxilasa (TH) y estereología (Fig. 3 y E3). En línea con un efecto de neuroprotección de NCS-1, la pérdida inducida por toxinas de neuronas DA de la SN y sus proyecciones axonales en el estriado dorsal fue alrededor del doble en el KO NCS-1 en comparación con WT, mientras que no se detectaron tales diferencias en el VTA o el estriado ventral entre WT y KO después de MPTP (Fig. 3 a, b, Fig.6a, b). En contraste, y coherente con un efecto degenerativo causal, las neuronas DA de la SN de KO Cav2.3 fueron completamente rescatadas en este modelo de PD: no se detectó pérdida de neuronas DA de la SN en KO Cav2.3, mientras que los animales WT mostraron una pérdida selectiva de DA de la SN de -50% (Fig. 3 c, d, Fig.6 c, d). Las señales de TH en el estriado confirmaron un rescate selectivo de los cuerpos neuronales DA de la SN y sus proyecciones axonales, ya que la señal restante en el estriado dorsal era casi el doble de alta en el KO Cav2.3 en comparación con WT.

Estos datos sugieren una emergente interacción funcional homeostática antagonista de NCS-1 y Cav2.3. En línea con esto, los niveles de ARNm de Cav2.3 son significativamente más bajos en las neuronas DA de la SN jóvenes y envejecidas de ratones KO NCS-1 (Fig. 4a), y los ratones KO NCS-1 mostraron alrededor de 30% menos neuronas DA de la SN (sin pérdida adicional con el envejecimiento como en WT), mientras que el número de neuronas DA del VTA no fue diferente del WT (Fig. 4b, Fig.7b, Tabla S8A). En contraste, las neuronas DA de la SN de humano de individuos adultos sanos (~42 años) o envejecidos (~71 años), y de pacientes con PD envejecidos (~80 años) mostraron proporciones similares de ARNm de NCS-1/Cav2.3 (Fig. 4c izquierda, Fig. 7c izquierda). Sin embargo, indicativo de elevados niveles de estrés mitocondrial, las neuronas DA de la SN de humano de controles y de pacientes con PD mostraron mayores grados de delecciones de ADN mitocondrial (definidos por proporciones de ADN genómico de las subunidades de NADH deshidrogenasa ND4/ND1 codificadas mitocondrialmente, (Fig. 4c derecha, Fig. 7c derecha), similar a estudios anteriores (*Bender et al., 2006, PMID: 16604074*). Además, los niveles de ARNm de ND1 fueron elevados en las neuronas DA de la SN de humano a partir de controles envejecidos y pacientes con PD, mientras que los niveles genómicos de ND1 no fueron alterados (Fig. 4c mitad, Fig. 7c mitad), argumentando a favor de una regulación positiva de la enzima ND1 en lugar de más mitocondrias en estas neuronas.

En conjunto, estos datos indican que en respuesta al aumento de las delecciones mitocondriales y al estrés metabólico durante la edad y la PD, las neuronas DA de la SN de humano regulan positivamente la expresión mitocondrial de ND1, aparentemente para compensar la disfunción de la mitocondria, pero son incapaces de alterar las proporciones de expresión de NCS-1/Cav2.3 como otro mecanismo compensatorio de protección.

En resumen (Fig. 4d), el inventor muestra que los canales Cav2.3 están activos durante la actividad de marcapasos y contribuyen sustancialmente a los niveles oscilatorios elevados de Ca^{2+} libre en el soma de las neuronas DA de la SN de ratón que muestran una vulnerabilidad particularmente alta a los estresores de la PD y se degeneran preferentemente en la PD. El inventor demuestra que la actividad del canal Cav2.3 estimula continuamente la señalización inhibitoria de NCS-1/D2-AR en las neuronas maduras DA de la SN y que la pérdida de la actividad de NCS-1 aumenta aún más la alta vulnerabilidad de las neuronas DA de la SN a la degeneración. Las oscilaciones de Ca^{2+} dependientes de la actividad en las neuronas DA de la SN están causalmente relacionadas con sus niveles de estrés metabólico y, como consecuencia a su mayor susceptibilidad a los estresores de la PD. Sin embargo, sólo en las dendritas distales, pero no en los cuerpos celulares de las neuronas DA de la SN, estas oscilaciones son sensibles al bloqueador de VGCC tipo L isradipina (Guzman *et al.*, 2010, PMID: 21068725; Ortner *et al.*, en prensa, PMID), mientras que las despolarizaciones de bajo umbral en las dendritas proximales son sensibles a los inhibidores de VGCC tipo T (Evans *et al.*, 2017, PMID: 28264982).

La genómica proporciona evidencia independiente del papel vital de Cav2.3 para el desarrollo y funcionamiento del cerebro humano. La secuenciación del exoma completo de más de 60,700 individuos no ha encontrado variantes genéticas de pérdida de la función (LoF), aunque se esperan más de 80 variantes de este tipo cuando se compara con el nivel de variación genética de todo el exoma. La intolerancia a la variación de LoF está enriquecida en genes relacionados con trastornos del neurodesarrollo (NDD). Estudios de secuenciación a gran escala han identificado ocho mutaciones diferentes de CACNA1E (que codifica para Cav2.3) de novo sin sentido o en el sitio de empalme en pacientes con NDD, discapacidad intelectual o autismo. Estas mutaciones se localizan cerca o dentro de los dominios transmembranales altamente conservados o de la región del poro de Cav2.3, y se predice que son deletéreas (Fig. 7d y Tabla S9 / Fig. 16). Será interesante observar si las variantes de CACNA1E también están asociadas con una susceptibilidad alterada a la PD.

El inventor muestra que en los cuerpos celulares de las neuronas DA de la SN las oscilaciones de Ca^{2+} están mediadas prominentemente por VGCCs Cav2.3, y se ha proporcionado evidencia de modelos de ratón y cerebros humanos *post mortem* para una interacción funcional antagonista de los canales Cav2.3 y NCS-1 en las neuronas DA de la SN (Fig. 17): a mayor actividad de NCS-1 mayor actividad estresora de Cav2.3 (y en menor medida actividad de VGCC Cav1.3) que las neuronas DA de la SN podrían tolerar. Debido a su actividad de marcapasos estimulada por los VGCCs, y a la estimulación por Ca^{2+} relacionada de la generación de ATP y estrés metabólico, las neuronas DA de la SN "viven al límite" energéticamente (Bolam and Pissadaki, 2012, PMID: 23008164; Duda *et al.*, 2016, PMID: 26865375), y los estresores adicionales de la PD (como las mutaciones PARK, los factores ambientales o simplemente el envejecimiento, son todos causantes como un evento unificador del estrés metabólico) se suman adicionalmente a su delicado equilibrio y podrían "inclinarse sobre el borde", Fig4d (Bolam and Pissadaki, 2012, PMID: 23008164; Duda *et al.*, 2016, PMID: 26865375; Surmeier *et al.*, 2017, PMID: 28104909). Este escenario podría explicar la alta vulnerabilidad de las neuronas DA de la SN y otras neuronas con niveles inherentes de estrés metabólico más altos a los estresores de la PD, como se sugirió anteriormente (Duda *et al.*, 2016, PMID: 26865375; Surmeier *et al.*, 2017, PMID: 28104909). Sin embargo, en contraste con el pensamiento actual, los experimentos de acuerdo con la invención sugieren fuertemente que este estrés relacionado con el Ca^{2+} en las neuronas DA de la SN es causado en gran parte por los VGCCs tipo R Cav2.3, más que por los VGCCs tipo L.

En consecuencia, los hallazgos del inventor son de particular importancia con respecto a los conceptos terapéuticos de la PD que se centran en la inhibición de los LTCCs Cav1.3 o Cav1.2 como estrategia de neuroprotección, y las pruebas actuales de ensayos clínicos de fase III. Los datos de acuerdo con la invención predecirían y podrían explicar un posible resultado no concluyente de ese ensayo, similar a los respectivos estudios de modelos de ratón con PD (Ilijic *et al.*, 2011, PMID: 21515375; Ortner *et al.*, 2017, PMID: 285926929). Los niveles plasmáticos que se alcanzan con la dosis máxima tolerable de 10 mg de isradipina/día (Parkinson Study, 2013, PMID: 24123224) podrían no ser suficientes para inhibir los canales Cav1.3 (y Cav1.2) en las neuronas DA de la SN, 2017 PMID: 28592699, y los estudios previos de los inventores podrían predecir que la inhibición de Cav1.3 podría ser protectora solo bajo condiciones que conduzcan a niveles transientes elevados de dopamina, como la terapia de reemplazo de dopamina (por ejemplo, con L-DOPA o rasagilina, un bloqueador terapéuticamente relevante de la monoaminoxidasa B) (Dragicevic *et al.*, 2014, PMID: 24934288; Poetschke *et al.*, 2015, PMID: 26381090; Oertel and Schulz, 2016, PMID: 27577098).

Más importante aún, los hallazgos del inventor identifican a los VGCCs Cav2.3 como dianas moleculares atractivas para reducir la carga de Ca^{2+} dependiente de la actividad en las neuronas DA de la SN como estrategia de neuroprotección en la terapia de la PD. En línea con los hallazgos de acuerdo con la invención, la regulación negativa de Cav2.3 en respuesta a un estresor de la PD (PARK1 humano) en neuronas colinérgicas de ratón del núcleo motor dorsal del nervio vago (DMV) ha sido (Goldberg *et al.*, 2012, PMID: 22941107) las neuronas DMV muestran un marcapasos basado en Ca^{2+} estresor similar que las neuronas DA de la SN, y también muestran las inclusiones de agregados de proteínas típicos (cuerpos de Lewis) presentes en la PD, pero por razones desconocidas son mucho menos vulnerables a la degeneración en la PD que las neuronas DA de la SN (Lasser-Katz *et al.*, 2017, PMID: 28053029), pero la regulación negativa de Cav2.3 en respuesta a factores estresores de la PD puede ofrecer una explicación.

En la actualidad no se dispone de ninguna pequeña molécula permeable al cerebro selectiva de Cav2.3 (Schneider et al., 2013, PMID: 24276260; Zamponi et al., 2015, PMID: 26362469) para probar si la inhibición farmacológica de estos canales podría ejercer un fuerte efecto de neuroprotección como lo que hemos observado en nuestro modelo de ratón de PD para deficiencia constitutiva de Cav2.3. Basándose en los hallazgos de acuerdo con la invención, debe de perseguirse el descubrimiento de tales compuestos. Basándose en esta invención, las aproximaciones de terapia génica basadas en Crispr/Cas9 que reducen o eliminan la expresión del gen Cav2.3 (es decir, CACNA1E que codifica para todas las variantes de empalme de Cav2.3 ofrecen una alternativa complementaria, novedosa basada en terapia génica para la terapia de neuroprotección de la PD y los trastornos neurodegenerativos relacionados. El inventor diseñó y probó con éxito construcciones de Crispr/Cas9 adecuadas, y un protocolo para su administración viral a las neuronas DA de la SN de ratones WT adultos (Fig. 7e), como prueba de principio para una aproximación de terapia génica de neuroprotección basada en Crispr/Cas9 que reduce la expresión del canal Cav2.3 en neuronas altamente vulnerables, en particular neuronas DA de la SN para la PD.

Dado que la vulnerabilidad diferencial de las distintas poblaciones neuronales al estresor neurodegenerativo es una característica distintiva de todas las enfermedades neurodegenerativas, y que el estrés metabólico elevado y la alteración de la homeostasis del calcio no sólo son factores interdependientes, sino que también parecen proporcionar un acontecimiento descendente general convergente crucial en las enfermedades neurodegenerativas y la pérdida de neuronas dependiente de la edad, esta invención ofrece con los canales Cav2.3 dianas atractivas para la intervención terapéutica de neuroprotección no sólo para las neuronas DA de la SN y de PD, sino también para otras enfermedades neurodegenerativas con patomecanismos relacionados.

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Animales y tratamiento con MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)

Ratones macho C57BL/6 y KO NCS-1 / tipo silvestre (WT) juveniles (-PN13), adultos (-PN90) y envejecidos (~PN360 y -PN550) (Ng, E. et al. Neuronal calcium sensor-1 deletion in the mouse decreases motivation and dopamine release in the nucleus accumbens. Behav Brain Res 301, 213-225, doi:10.1016/j.bbr.2015.12.037 (2016)) fueron criados en el animalario de la Universidad de Ulm. Los ratones KO Cav2.3 y controles (Pereverzev, A. et al. Disturbances in glucose-tolerance, insulin release, and stress-induced hyperglycemic upon disruption of the Ca(v)2.3 (alpha 1EJ subunit of voltage-gated Ca(2+) channels. Mol Endocrinol 16, 884-895, doi:10.1210/mend.16.4.0801 (2002)) fueron criados en la Universidad de Colonia. Las inyecciones y perfusiones de MPTP se llevaron a cabo en la Universidad de Göttingen. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el German Regierungspräsident Tübingen (Ref: 35/9185.81-3; TV-No. 921, 1043 and 1291, Reg. Nr. o.147) o el German Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Ref: 84-02.04.2016.A505), y llevados a cabo de acuerdo con las directrices respectivas (para MPTP en particular, véase Jackson-Lewis, Przedborski, 2007, PMID: 17401348). Los ratones fueron inyectados 10 veces con clorhidrato de MPTP (20 mg/kg en salina, por vía subcutánea, Sigma) y probenecida (250 mg/kg en amortiguador PBS, por vía intraperitoneal, Thermo Fisher) durante 5 semanas cada 3.5 días. El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica y su metabolito activo MPP⁺ es un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. MPP⁺ induce estrés metabólico y pérdida selectiva de neuronas DA de la SN, pero no de neuronas DA del VTA, y Parkinsonismo en ratones y hombres. La probenecida retrasa la excreción renal de MPP⁺ y, por tanto, las variaciones biológicas (Meredith, G. E. & Rademacher, D. J. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. J Parkinsons Dis 1, 19-33, doi:10.3233/JPD-2011-11023 (2011)). A los ratones de control sólo se les inyectó salina y probenecida. Una semana después de las últimas inyecciones, los ratones fueron sacrificados y perfundidos con PFA para inmunohistoquímica.

Ejemplo 2: Tejido cerebral humano

Se obtuvieron bloques de mesencéfalo humano *post mortem* congelados instantáneamente en hielo seco del Banco Alemán de Cerebros (BrainNet). Toda la información disponible sobre los respectivos donadores y tejidos se resumen en la Tabla Suplementaria S3 (Fig. 10). Todos los experimentos con material humano fueron aprobados por la comisión ética de la Universidad de Ulm (247/10-UBB/bal). El Banco Alemán de Brian obtuvo el consentimiento de todos los sujetos.

Ejemplo 3: Rastreo retrógrado *in vivo*

El rastreo retrógrado se realizó esencialmente como se describe en Krabbe, S. et al. Increased dopamine D2 receptor activity in the striatum alters the firing pattern of dopamine neurons in the ventral tegmental area. Proc Natl Acad Sci U S A 112, E1498-1506, doi:10.1073/pnas.1500450112 (2015). Para el etiquetado retrógrado de las neuronas DA de la SN nigroestriales y DA del VTA mesolímbicas de ratones adultos, se inyectaron retrobeads de látex fluorescente rojo (Lumafuor) unilateralmente en el estriado dorsal (putamen caudado, CPU. Coordenadas: Bregma (eje y) 0.98 y -0.1 mm, lateral (eje x) 1.9 y 2.70 mm, ventral (eje z) -3.2 mm, 2x 60 nl) o bilateralmente en el estriado ventral (Núcleo accumbens, núcleo NAc y envoltura medial).

Coordenadas: Bregma (eje y) 1.6 mm, lateral (eje x) 0.8 mm, ventral (eje z,) -4.0 mm, 60 nl) de ratones anestesiados. La inyección de retrobead se realizó bajo control estereotáctico (Kopf Instruments) con una jeringa NanoFil conectada a una microbomba (UMP3 con controlador SYS-Micro4; World Precision Instruments) a una tasa de 50 nl/min para el trazado SN y 30 nl/min para el trazado VTA. Los animales fueron sacrificados 7 días (CPu) o 14 días (NAc) después de la inyección de retrobead para la obtención de imágenes de calcio (DA del VTA) o UV-LMD y análisis de RT-qPCR (neuronas DA de la SN). Los sitios de inyección se verificaron de acuerdo con el atlas del cerebro del ratón (Paxinos, G. & Franklin, K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic. Nueva York). (2007)) como se describe en *Krabbe S. et al.* (ref. como anteriormente).

Ejemplo 4: Registros electrofisiológicos *in vitro* de cortes de cerebro de ratón juvenil y adulto

Las preparaciones de cortes coronales de cerebro de ratón y los registros electrofisiológicos *in vitro* de células completas, células adheridas y fijación en parche de neuronas DA de la SN en cortes de mesencéfalo de ratón de 200-250 µm se llevaron a cabo esencialmente como se describe (véase Dragicevic, E. et al. Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons. *Brain* 137, 2287-2302, doi:10.1093/brain/awu131 (2014); Poetschke, C. et al., Compensatory T-type Ca²⁺ channel activity alters D2-autoreceptor responses of Substantia nigra dopamine neurons from Cav1.3 L-type Co²⁺ channel KO mice. *Sci Rep* 5, 13688, doi:10.1038/srep13688 (2015)). Brevemente, las neuronas DA de la SN se identificaron de acuerdo con su localización anatómica, morfología y huella electrofisiológica típica. Los patrones de actividad se registraron en presencia de 10 µM de DNQX (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona, Tocris) y 10 µM de gabacina (SR95531 hidrobromuro, Tocris) para la inhibición de la transmisión sináptica rápida, en parche unido a células o perforado (100 µg/ml de gramicidina, Sigma) para mantener la señalización intracelular (o de célula completa para 0.1 mM de EGTA, Sigma). Para la autoinhibición de dopamina, después de registrar un mínimo de 5 min de actividad basal estable, se aplicó 100 µM de clorhidrato de dopamina (Sigma) en aCSF mediante baño de perfusión durante 15 min, seguido de 20 min de lavado. La frecuencia media de cada minuto se normalizó a la frecuencia de línea de base respectiva para cada célula. Para la farmacología, los cortes se preincubaron con 10 µM de DNIP, un péptido que impide la interacción de D2/NCS-1 (Dragicevic, E. et al. véase la referencia anterior; Saab, B. J. et al. NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron* 63, 643-656, doi:10.1016/j.neuron.2009.08.014 (2009)), sintetizado por Genscript, 860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854, EE.UU. (<http://www.genscript.com/index.html>), o 300 nM de isradipina (Tocris) para bloquear los canales de Ca²⁺ tipo L, o 10 µM de Z941 (proporcionado por el Prof. T. P. Snutch, Universidad de Columbia Británica, 301 - 2185 East Mall, Vancouver, BC Canada V6T1Z4) para bloquear los canales de Ca²⁺ tipo T (Tringham, E. et al. T-type calcium channel blockers that attenuate thalamic burst firing and suppress absence seizures. *Sci Transl Med* 4, 121ra119, doi:10.1126/scitranslmed.3003120 (2012)), o 1 µM de ω-conotoxina MVIIC (Tocris) para bloquear los canales de Ca²⁺ tipo N, P/Q, o 100 nM de SNX-482 (Tocris) para bloquear los canales de Ca²⁺ tipo R, baño aplicado (en aCSF) durante al menos 30 minutos antes y durante los registros. Las células se volvieron a parchar para realizar registros de células completas de las propiedades biofísicas basales para verificar la identidad de la DA de la SN (es decir, componente de hundimiento/corriente I_h lenta, corriente tipo A, potenciales de acción amplios).

Ejemplo 5: Obtención de imágenes de calcio y electrofisiología combinados a partir de cortes de cerebro de ratón adulto

Los experimentos se realizaron de la misma manera que se describió anteriormente (*Hess, M. E. et al., referencia como anteriormente*); Konner, A. C. et al. Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell metabolism* 13, 720-728, doi:10.1016/j.cmet.2011.03.021 (2011); Ortnet et al., 2017 *J. neurosci.*, en prensa). Las neuronas DA de la SN se identificaron como se describió anteriormente, y post hoc mediante inmunohistoquímica para TH. Las neuronas DA del VTA mesolímbicas se identificaron mediante rastreo retrógrado, huellas electrofisiológicas y post hoc mediante inmunohistoquímica para TH. Para este estudio sólo se analizaron las neuronas 43 electrotípicas del Núcleo Accumbens / NA del VTA de la envoltura medial. Los registros de fijación en parche se realizaron con solución de pipeta que contiene 1% de biocitina (Sigma) y (en mM): 128 de gluconato K, 10 de KCl, 10 de HEPES, 2 de MgCl₂, y ajustado a pH 7.3 con KOH. Las pipetas se llenaron en la punta con solución interna y se rellenaron con solución que contenía anfotericina B (-200 µg/ml en DMSO, preparado fresco; Sigma). Para la obtención de imágenes de Ca²⁺, se añadieron 250 µM de sulfinpirazona (S9509, Sigma) al aCSF. La configuración de la obtención de las imágenes consistió en una cámara CCD Imago/SensiCam con un chip de 640x480 (Till Photonics) y un Policromador IV (Till Photonics) acoplado mediante una fibra óptica al microscopio vertical. El Fura-2 se excitó a 340 nm, 360 nm o 380 nm (espejo dicróico de 410 nm; DCLP410, Chroma). La fluorescencia emitida se detectó a través de un filtro de paso largo de 440 nm. Los datos se adquirieron como marcos de 80x60 utilizando un agrupamiento de 8x8 en el chip. Las imágenes se registraron en unidades analógico a digitales (ADUs) y se almacenaron y analizaron como imágenes en escala de grises de 12 bits. Antes de establecer los registros con fijación en parche, se cargó fura-2 en las neuronas mediante electroporación (1 V con 1 ms de duración del pulso a 65 Hz durante 10 - 15 s). La pipeta de carga contenía salina intracelular y 3.6 mM de fura-2 (sal de pentapotasio, F1200, Life Technologies). La carga se monitoreó a una excitación de 360 nm para alcanzar estados de carga comparables (128 ± 9 ADU, n = 45). Para medir la dinámica del Ca²⁺, se tomaron pares de marcos excitados con 340 nm y 380 nm a 25 Hz (actividad de marcapasos) o 10 Hz (potenciales de acción inducidos por corriente,

APs). Se utilizó el valor medio de ADU dentro de una región de interés (ROI) a partir del soma. La ROI se ajustó para cada célula. Para la "sustracción de fondo" de la serie de tiempo completo se eligió una segunda ROI adyacente. Los datos se analizaron como proporciones normalizadas de fura-2 F340/F380. Se calcularon las amplitudes medias de 20 oscilaciones para cada neurona analizada. Dado que la dinámica de Ca²⁺ asociada al AP depende en fuertemente de la frecuencia, la frecuencia del AP se ajustó para la obtención de imágenes de Ca²⁺ en todas las neuronas registradas a un valor similar de ~1.5 Hz. Como las neuronas DA de la SN de ratones (+/+) y C57BL/6 no mostraron diferencias significativas, se agruparon los datos. Para la farmacología, se aplicó un baño de 100 nM de SNX-482 (Tocris) (en aCSF) durante al menos 30 min antes y durante los registros. Como SNX-482 además de Cav2.3 también inhibe los canales de K⁺ tipo A Kv4.3 sensibles al voltaje con alta afinidad nanomolar (Kimm, T. & Bean, B. P. Inhibition of A-type potassium current by the peptide toxin SNX-482. *J Neurosci* 34, 9182-9189 doi:10.1523/JNEUROSCI.0339-14.2014 (2014)), y como los canales Kv4.3 se expresan de forma prominente en las neuronas DA de la SN, y son cruciales para su actividad de marcapasos y vulnerabilidad (Kimm, T. & Bean, B. P. Inhibition of A-type potassium current by the peptide toxin SNX-482. *J Neurosci* 34, 9182-9189, doi:10.1523/JNEUROSCI.0339-14.2014 (2014)), el inventor realizó experimentos de obtención de imágenes de Ca²⁺ de SNX-482 en presencia de los bloqueadores de canales tipo A 4-aminopiridina (4 mM, Sigma). Para los experimentos de SNX-482, las neuronas se hiperpolarizaron a ~-70 mV y se inyectaron corrientes despolarizantes (50 - 70 ms, 50 - 80 pA) para inducir dos potenciales de acción. El etiquetado con biocitina-estreptavidina combinado con inmunohistoquímica de TH para la confirmación del fenotipo DA se realizó como se describe (Hess, M. E. et al. The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Not Neurosci* 16, 1042-1048, doi:10.1038/nn.3449 (2013)).

Ejemplo 6: Crio-seccionamiento, microdissección con láser UV y análisis de RT qPCR

Se cortaron crio-secciones coronales (ratones) y horizontales (humanos) de 12 µm y se montaron en portaobjetos de membrana PEN (Mirodissect) esencialmente como se describió anteriormente (véase *Krabbe S. et al.* (ref. como anteriormente); véase también Schlaudraff, F. et al. Orchestrated increase of dopamine and PARK mRNAs but not miR-133b in dopamine neurons in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 35, 2302-2315, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.016 (2014)). La microdissección con láser UV (UV-LMD) de las neuronas DA de la SN a partir de secciones de mesencéfalo teñidas con violeta de cresilo de ratones jóvenes y tejido humano, o de secciones de mesencéfalo de ratón adulto trazadas retrógradamente, se llevó a cabo utilizando un sistema LMD7000 (Leica Microsystems). La UV-LMD, la lisis celular, la síntesis de ADNc, la precipitación, la PCR multiplex anidada (para el análisis de genes marcadores de las muestras murinas) y la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de las muestras de UV-LMD se realizaron como se describe (véase *Krabbe S. et al.* (ref. como anteriormente); *Schlaudraff, F. et al.* (ref. como anteriormente); Duda, J., Foulmer, M., Grundemann, J. & Liss, B. Cell-specific RNA quantification in human DA de la SN neurons from heterogeneous post mortem midbrain samples by UV-laser microdissection and RT-qPCR. *Methods Mol Biol* (en prensa)). Para las muestras humanas, sólo se recolectaron neuronas positivas para neuromelanina y sólo se analizaron adicionalmente muestras de UV-LMD positivas para tirosina hidroxilasa (TH). Para las muestras derivadas de ratón, sólo se utilizaron para el análisis de qPCR las muestras que expresaban un perfil correcto de genes marcadores: positivo para TH y negativo para calbindina d28k (CB), proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y l-glutamato descarboxilasa (GAD_{65/67}). Los detalles de todos los cebadores y ensayos de qPCR (TaqMan), y los respectivos parámetros de la curva estándar (derivados de ADNc de ratón o humano de los respectivos tejidos del mesencéfalo) utilizados para el análisis de RT-qPCR se proporcionan en la Tabla Suplementaria S1 y S2 (Fig. 8, Fig.9).

Para la cuantificación absoluta del número de moléculas de ADNc de Cav1.2, Cav1.3, Cav2.3 y NCS-1, se utilizaron cantidades definidas de moléculas de ADN para generar curvas estándar, esencialmente como se describió anteriormente (Liss, B. et al. Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J* 20, 5715-5724, doi:10.1093/emboj/20.20.5715 (2001); Ortner, N. J. et al. Lower affinity of isradipine for L-type Ca²⁺ channels during Substantia nigra dopamine neuron-like activity: implications for neuroprotection in Parkinson's disease. *J Neurosci* (en revisión)). Para la amplificación de los fragmentos de ADNc que cubren las localizaciones del ensayo TaqMan®, se utilizaron los siguientes cebadores: mCav1.2 delantero: TCACCACTCTGCTGCAGTTC, reverso: GACGAAACCCACGAAGATGT (tamaño del amplicón: 392 pb); mCav1.3 delantero: TCGGGACTGGTCTATTCTGG, reverso: TACTTCCCCACCACTCCTTG (480 pb); mCav2.3 delantero: TTGGATCTGCTTGCCCATG, mCav2.3 reverso: GGAATTTGAACGCTTATCCCGAA (tamaño del amplicón: 543 pb o 414 pb dependiendo de la expresión de la variante de empalme); mNCS-1 delantero: CCGAGCATGGGAAATCCAAC, mNCS-1 reverso: TCATGGCAAAGATCCGGTCCAC (472 pb). Después de la electroforesis en gel, se purificaron los productos de la PCR (Kit de extracción del gel QIAquick) y se cuantificaron (con un fluorómetro Qubit 3.0). Se utilizaron estándares de ADN que contienen 1.000.000 de moléculas hasta 1 molécula (en pasos diluidos 10 veces) para generar curvas estándar absolutas de ADNc.

La cantidad relativa de ADNc con respecto a una curva estándar de ADNc derivado de tejido del mesencéfalo (para el ensayo humano y el ensayo murino de D2s y D2l) y el número de moléculas de ADNc (para datos murinos de Cav1.2, Cav1.3, Cav2.3 y NCS-1) por célula se calcularon de acuerdo con la referencia de *Duda, J. et al.* como anteriormente; Grundemann, J., Schlaudraff, F. & Liss, B. UV-laser microdissection and mRNA

expression analysis of individual neurons from postmortem Parkinson's disease brains. *Methods Mol Biol* 755, 363-374, doi:10.1007/978-1-61779-163-5_30 (2011):

$$\text{cantidad de ADNc/moléculas por célula} = \frac{S/(C - \text{intercepto } Y)/\text{pendiente}}{\text{No. de células} \cdot \text{fracción de ADNc}}$$

Con S = factor de dilución en serie de la curva estándar (es decir, 10), No_{de células} = número de neuronas DA de la SN cosechadas por muestra (es decir, 10 para muestras de ADNc de ratón y 20 para muestras de humano o 1 para muestras de ADN genómico humano, respectivamente), fracción de ADNc = fracción de la reacción de ADNc de UV LMD utilizada como templado en las reacciones de qPCR individuales (es decir, ADNc de 5/17 para todos los genes de ratón, 1/9 para Cav2.3 humano, 2/33 para NCS-1 humano y ND1 humano y 1/12 para ND1/ND4 genómico humano) y el intercepto Y de los estándares absolutos, o estándares relativos (). Los niveles de expresión de las neuronas DA de la SN de ratón se normalizaron para que fueran iguales a 1, para los juveniles para las comparaciones con los adultos, y con los WT para las comparaciones KO. Los niveles de expresión de las neuronas DA de la SN de humano se normalizaron a 1 para los adultos en las comparaciones de ARNm y ADNg, y a la de los niveles sanguíneos no degradados para las proporciones ND4/ND1.

El ADN genómico mitocondrial se aisló de neuronas DA de la SN de humano después de UV-LMD con el Micro Kit de ADN QiaAmp (Qiagen) como se describió previamente (Muhling, T., Duda, J., Weishaupt, J. H., Ludolph, A. C. & Liss, B. Elevated mRNA-levels of distinct mitochondrial and plasma membrane Co(2+) transporters in individual hypoglossal motor neurons of endstage SOD1 transgenic mice. *Front Cell Neurosci* 8, 353, doi:10.3389/fncel.2014.00353 (2014)). El ADN se eluyó en 30 µl de agua de calidad para biología molecular y se almacenó a 4°C hasta la qPCR. Para el análisis de la integridad del ADN mitocondrial se determinó el número de copias del gen humano ND4, que se suprime en el 96% de todos los casos de supresión, así como el número de copias del gen humano ND1, que casi nunca se suprime en humanos. La proporción relativa respectiva de ND4/ND1 (entre 1 y 0) indica el porcentaje de genomas mitocondriales totalmente intactos. (Bender, A. et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38, 515-517, doi:10.1038/ng1769 (2006); He, L. et al. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e68 (2002); Krishnan, K. J., Bender, A., Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells. *Anal Biochem* 370, 127-129, doi:10.1016/j.ab.2007.06.024 (2007)). Las proporciones de ND4/ND1 derivadas del ADN aislado fresco de muestras de sangre de humano se utilizaron como estándar relativo para el ADN mitocondrial totalmente intacto.

Para el análisis de la variante de empalme de Cav2.3, dos fragmentos de ADNc (bucle II-III de mCav2.3 y C terminal de mCav2.3) que cubrían los tres sitios de empalme respectivos se amplificaron en una PCR dúplex, seguida de dos reacciones individuales de PCR anidada. Condiciones de la PCR: 15 min, 95°C; 35 ciclos: 30 s a 94°C; 1 min a 61°C; 3 min a 72°C; 7 min, 72°C para PCR dúplex. 3 min a 94°C; 35 ciclos: 30 s a 94°C; 1 min a 61°C; 1 min a 72°C; 7 min, 72°C para PCR anidadas. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla S1. Los pares de cebadores dúplex externos se eligieron utilizando el software Oligo7.60 (posibles tamaños de amplicón de la PCR del bucle II-III de mCav2.3: 816 pb, 795 pb y 759 pb; C terminal de mCav2.3: 770 pb y 641 pb). Para las dos PCR anidadas individuales, se utilizaron secuencias de cebadores de 23 (posibles tamaños de amplicón de la PCR del bucle II-III de mCav2: 420 pb, 399 pb y 363 pb; C terminal de mCav2.3: 498 pb y 369 pb). Los productos de la PCR anidada se separaron en un gel de 4% de agarosa (MetaPhor agarosa, Biozym), y las variantes de empalme expresadas (tejido cerebral completo de ratón como control positivo, y en neuronas DA de la SN individuales) se identificaron de acuerdo con los tamaños de amplicón de los productos de la PCR anidada:

	Fragmento de la PCR anidada del bucle II-III	Fragmento de la PCR anidada del C terminal
Cav2.3a	363 pb	369 pb
Cav2.3b	399 pb	369 pb
Cav2.3c	420 pb	369 pb
Cav2.3d	420 pb	498 pb
Cav2.3e	363 pb	498 pb
Cav2.3f	399 pb	498 pb

Canal de calcio tipo R Cav2.3 de ratón (Cacna1e)	F (bucle II-III externo)	CCATCTACTTCATTGTGCTCACC	NM_009782.3	2043	816
	R (bucle II-III externo)	CCCCTTCATCCAGACTCCG		2858	
	F (C terminal externo)	GACAGCAGCTGGAAGAACAGA		5670	641
	R (C terminal externo)	GATGGAGCTCTCACTTAGGGAAC		6310	
	F (bucle II-II interno)	GGAGGTCAGCCCGATGTC		2203	420
	R (bucle II-III interno)	GGGCTCCTCTGGTTGTCC		2622	
	F (C terminal interno)	CTGAGTGGTCGGAGTGGATAC		5795	369
	F (C terminal interno)	AGAGAGGAGGTGCTTTCGTTTC		6163	

Fuente de las variantes de empalme utilizadas: Schneider, Dubue, Hescheler: How "Pharmacoresistant" is Cav2.3, the Major Component of Voltage-Gated R-type Ca²⁺ Channels? *Pharmaceuticals* (Basilea). 2013;6(6):759-76. doi: 10.3390/ph6060759.

5 Ejemplo 7: Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó esencialmente como se describe en Liss, B. et al. K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nat Neurosci* 8, 1742-1751, doi:10.1038/nn1570 (2005). Después de la post fijación de los cerebros en PFA a 4°C, se almacenaron en 0.05% de NaN₃ en PBS a 4°C. Antes de cortarlos, los cerebros se incubaron durante 1 h en solución de corte (10% de sacarosa y 0.05% de NaN₃ en PBS) a 4°C. Se cortaron con un vibratomo (VT 1000S, Leica) secciones coronales de 30 µm del mesencéfalo para el análisis estereológico y secciones coronales de 100 µm del estriado coronal para el análisis de las fibras estriatales. Los cortes flotantes libres se lavaron tres veces en PBS durante 10 minutos cada uno con agitación (300 rpm, agitador de microplacas, VWR) y se trataron durante 2 h con una solución de bloqueo (10% de suero normal de cabra, 0.2% de BSA y 0.5% de Triton X-100 en PBS). Después de lavar los cortes con PBS, se aplicó anti-TH de conejo (1:5000, Merck Millipore) en una solución portadora (1% de suero de cabra, 0.2% de BSA y 0.5% de Triton X-100 en PBS) y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente mientras se agitaba (300 rpm, agitador de microplacas, VWR). Los cortes se lavaron tres veces en 0.2% de Triton X-100 en PBS durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-conejo de cabra biotinilado, 1:1000, Vector Laboratories) durante 2 h a temperatura ambiente mientras se agitaban (300 rpm, agitador de microplacas, VWR) en la solución portadora como se describió anteriormente. La tinción de TH se visualizó utilizando un kit DAB (Vector Laboratories). Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio, se deshidrataron y se cubrieron con un cubreobjetos para análisis adicional estereológico y de densidad óptica.

Ejemplo 8: Densitometría óptica y análisis estereológico

La densitometría óptica y el análisis estereológico esencialmente como se describe en Liss, B. et al. (ref. como anteriormente). Las regiones de interés (estriado dorsal, estriado ventral, SN y VTA) se identificaron de acuerdo con distintivos anatómicos establecidos (atlas del cerebro de ratón de Paxinos [Paxinos, G. & Franklin, K. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic. Nueva York). (2007)]), y los datos se ajustaron para las diferencias sistemáticas en las intensidades de la señal de TH en las muestras que no se procesaron en paralelo. Las densidades ópticas relativas de la señal de inmunorreactividad de DAB derivada de TH estriatal se determinaron utilizando software de obtención de imágenes digital (imagenología). Las imágenes se adquirieron con el software LMD 8.1.0.6156 (Leica). Se cuantificó la señal de TH-DAB estriatal en 18 secciones estriatales seriadas dorsales y 10 ventrales, cubriendo todo el eje caudorostral (bregma -0.3 a 1.7 para el estriado dorsal y bregma 0.6 a 1.7 para el estriado ventral). Las señales respectivas de las cortezas se restaron como fondo.

El número total de neuronas TH⁺ en SN y VTA se determinó con estereología de alta resolución, utilizando un método de fraccionamiento óptico insesgado (Stereo Investigator Software; MBF Bioscience). Se analizaron 40 secciones seriadas teñidas con TH, cubriendo todo el eje caudorostral (bregma -3.8 a -2.7) del mesencéfalo

murino (cada sección para SN, cada segunda sección para VTA). El número total estimado de neuronas TH⁺ (N) se calculó para cada animal de acuerdo con la ecuación (1):

$$(1) N = \sum Q^- \cdot \frac{t}{h \cdot asf \cdot ssf}$$

con $\sum Q^-$ = número de neuronas contadas, t = grosor medio de la sección, h = altura del marco de recuento (es decir, 11 μ m), asf = fracción de muestreo del área (es decir, 0.44), y ssf = fracción de muestreo de la sección (es decir, 1 para SN y 2 para VTA). Las dimensiones de la rejilla de muestreo eran de 75 \times 75 μ m (ejes x, y) y el tamaño del marco de recuento era de 50 \times 50 μ m (ejes x, y). La fiabilidad de la estimación se evaluó mediante el coeficiente de Gundersen (CE, m = 1) de acuerdo con la ecuación (2):

$$(2) CE = \frac{\sqrt{s^2 + VAR_{SRS}}}{s^2}$$

$$(3) VAR_{SRS} = \frac{3(A - s^2) - 4B + C}{240}$$

para m=1 con

$A = \sum_{i=1}^n (Q_i^-)^2$; $B = \sum_{i=1}^{n-1} Q_i^- Q_{i+1}^-$; $C = \sum_{i=1}^{n-2} Q_i^- Q_{i+2}^-$ con s^2 = varianza debida al ruido y VAR_{SRS} = varianza debida al muestreo aleatorio sistemático, de acuerdo con la ecuación (3) para m = 1.

Los valores de CE fueron todos ≤ 0.05 para todos los animales analizados. Los ejes caudorostrales se generaron graficando las densidades ópticas relativas medias o el número absoluto medio de neuronas contadas para cada sección analizada de cada animal.

Ejemplo 9: Alineamiento de secuencias múltiples y análisis de datos de secuenciación de exomas a gran escala

El alineamiento múltiple de secuencias de proteínas se realizó mediante Clustal Omega () utilizando los parámetros predeterminados. Para el alineamiento se utilizaron las siguientes secuencias de humano RefSeq: CACNA1E/Cav2.3 (NP_001192222), CACNA1A/Cav2.1 (NP_075461), CACNA1B/Cav2.2 (NP_000709), CACNA1S/Cav1.1 (NP_000060), CACNA1C/Cav1.2 (NP_955630), CACNA1D/Cav1.3 (NP_000711), y CACNA1F/Cav1.4 (NP_005174). La puntuación de la "probabilidad de ser intolerante a la mutación por pérdida de función (LoF)" (puntuación pLI) (Lek et al., 2016; PMID: 27535533) se evaluó en la base de datos ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>). Ninguna de las ocho mutaciones de novo descritas en CACNA1E/Cav2.3 en pacientes con NDD, ID o autismo (presentadas en la Tabla S9 y Fig. 7d) está presente en más de 80,000 alelos de control, y todas ellas se predicen como deletéreas por los programas independientes de predicción CADD (Kircher et al., 2014; PMID: 24487276), Polyphen-2 (Adzhubei et al., 2010; PMID: 20354512) y REVEL (Ionidis et al., 2016; PMID: 27666373). La lista completa de los grupos contribuyentes al Consorcio de Agregación de Exomas puede consultarse en <http://exac.broadinstitute.org/about>.

Ejemplo 10: Eliminación de canales Cav2.3 mediada por Crispr/Cas9 a través de la administración viral a neuronas DA de la SN.

Sintetizamos construcciones del virus adeno-asociado 2 (AAV2) que contenían dos casetes de expresión independientes: Proteína 9 de Staphylococcus aureus asociada a CRISPR etiquetada con AU1 en el C terminal (SaCas9) (Ran et al., 2015; PMID: 25830891) impulsada por el promotor del gen de la sinapsina 1 de humano (hSyn) específico de neurona, así como la secuencia de ARN guía (ARNg, T2 o T3) seguida de la secuencia de andamio específica de SaCas9 e impulsada por el promotor U6. La construcción se diseñó para la eliminación mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Las secuencias diana, situadas en el exón 1 de Cacna1e, fueron:

CCTTGTCGGTTCCTGCTCTGGT**CCGAGT** (T2), y

CCGCCGGCCCCGAGGCCGGGAC**GGGGGT** (T3), mientras que las secuencias subrayadas en negritas delimitan los motivos adyacentes al protoespaciador (PAM) y las secuencias no subrayadas son complementarias reversas a la diana Cacna1e y corresponden al ARNg. Las construcciones fueron sintetizadas y amplificadas mediante GenScript (NJ, EE.UU.) y empaquetados en cápsides AAV2 por Vigene Biosciences (MD, EE.UU.). Los títulos fueron de 2.7 (T2) o 4.2 (T3) $\times 10^{13}$ UI/ml, respectivamente, y las suspensiones se inyectaron ya sea sin diluir o diluidas hasta un título aproximado de 5 $\times 10^{12}$ UI/ml en salina estéril. Para la SN de ratones adultos, se inyectaron en anteroposterior (AP) -3.2 y en mediolateral (ML) 1.0 con respecto al bregma, 900 nl cada uno a 4.2 y 4.0 mm de la pia. Para las transfecciones combinadas hipocampal / neocortical (como controles), se inyectaron en AP -2.0 y ML 1.5 en relación con el bregma, 500 nl cada uno a 1.3 y 0.8 mm de la pia (procedimiento similar como en el Ejemplo 3). Los animales se sacrificaron 3-5 semanas después de la cirugía, y la expresión de Cas9 se confirmó mediante tinción inmunohistoquímica (como en el Ejemplo 7)

contra AU1 (MMS-130R, Covance, diluido 1:1000). La edición exitosa del genoma se valida utilizando el kit de detección de mutaciones Surveyor (IDT).

Ejemplo 11: Análisis de datos

El análisis de datos y las ilustraciones gráficas se realizaron utilizando el software FitMaster (HEKA Electronics), GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc.), Adobe Illustrator CC2015.3 (Adobe Systems Software Ireland Limited), Igor Pro 6 (Wavemetrics Inc.), Spike2 (CED), Neuroexplorer (Nex Technologies), SDS 2.4 (Applied Biosystems), Stereo Investigator (MBF Bioscience) e ImageJ (NIH).

Para la normalización de los datos de MPTP, ya que no hay controles individuales para los ratones individuales tratados con MPTP, se calculó el % de fibras / neuronas positivas para TH restantes en los grupos tratados con MPTP con respecto a la media del grupo correspondiente tratado con salina (particularmente importante para KO NCS-1, ya que los controles KO tenían un número menor de neuronas DA de la SN que WT, comparar Fig. 2e) y proporcionados en la Fig. 3 y Tabla Suplementaria S8C, Fig. 15. En una aproximación alternativa de bootstrap, cada valor individual de MPTP se comparó con cada valor individual de salina de los respectivos grupos para calcular el % de intensidad de la señal TH restante y el número de neuronas (véase Fig.6, y Tabla Suplementaria S8D, Fig. 15).

Los tamaños de las muestras para todos los datos derivados de ratones se eligieron de acuerdo con el departamento de Biometría, y de acuerdo con lo aprobado por el "Regierungspräsidium" alemán. El tamaño de la muestra para los datos *post mortem* de humano estaba limitado por el tejido respectivo que el inventor podía obtener del Banco de Cerebros alemán. El experimentador estaba ciego sólo para el análisis estereológico. No se aplicó ningún procedimiento particular para la aleatorización/asignación de los ratones WT y KO a los respectivos grupos experimentales. Los datos se obtuvieron de al menos N = 3 ratones individuales o N = 5 muestras humanas individuales.

Se probó la presencia de valores atípicos en los datos mediante la función ROUT de GraphPad Prism 7. Las pruebas de diferencias estadísticamente significativas se realizaron en el software GraphPad Prism 7. La mayoría de las varianzas fueron similares entre los grupos que se compararon. Las pruebas estadísticas paramétricas sólo se eligieron si los datos tenían una distribución normal. La distribución normal se probó con la prueba de normalidad ómnibus de D'Agostino-Pearson. Como los valores de n eran bajos en general, se realizaron sin importar pruebas no paramétricas más conservadoras en cualquier caso, incluso si los datos estaban distribuidos normalmente. Para las comparaciones de grupos múltiples, Kruskal Wallis no paramétrico con prueba post hoc de Dunn o si se requiere. Las gráficas de frecuencia a lo largo del tiempo se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de dos vías de medidas repetidas. Si no se indica lo contrario, se utilizaron pruebas no pareadas.

Las significancias estadísticas se indican como $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) y $p < 0.0001$ (****), en la mayoría de los casos se aplicaron pruebas no paramétricas conservadoras; las pruebas individuales se proporcionan en las Tablas Suplementarias S4-S8 (Fig. 11-15). En las gráficas de barras, los datos se expresan como media \pm SD o SEM (según se indique). Las líneas horizontales de las gráficas de caja indican la mediana de los datos, el signo + indica la media de los datos, las cajas indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 10 y 90 de los datos.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antagonista del canal de calcio tipo R Cav2.3 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en el que el antagonista es una construcción de CRISPR/Cas9, y en el que dicho antagonista inhibe parcial o totalmente la expresión funcional del gen de la subunidad alfa 1E del canal de calcio activado por voltaje (CACNA1E).
2. Antagonista del canal de calcio tipo R Cav2.3 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antagonista se utiliza en combinación con miméticos de dopamina seleccionados del grupo que consiste en L-Dopa, agonistas de los receptores de dopamina e inhibidores de la monoaminoxidasa (inhibidores de la MAO).

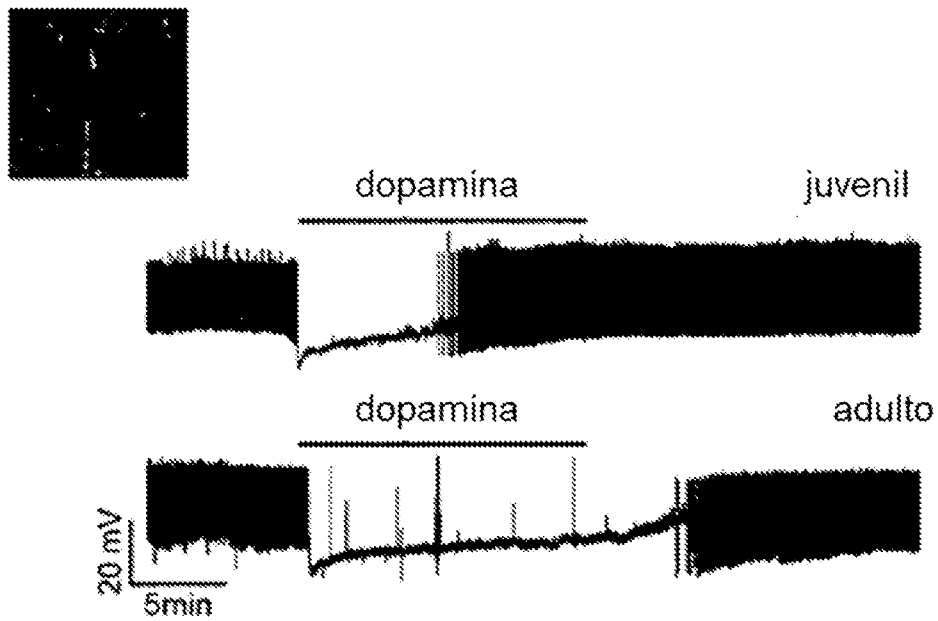


Fig. 1a

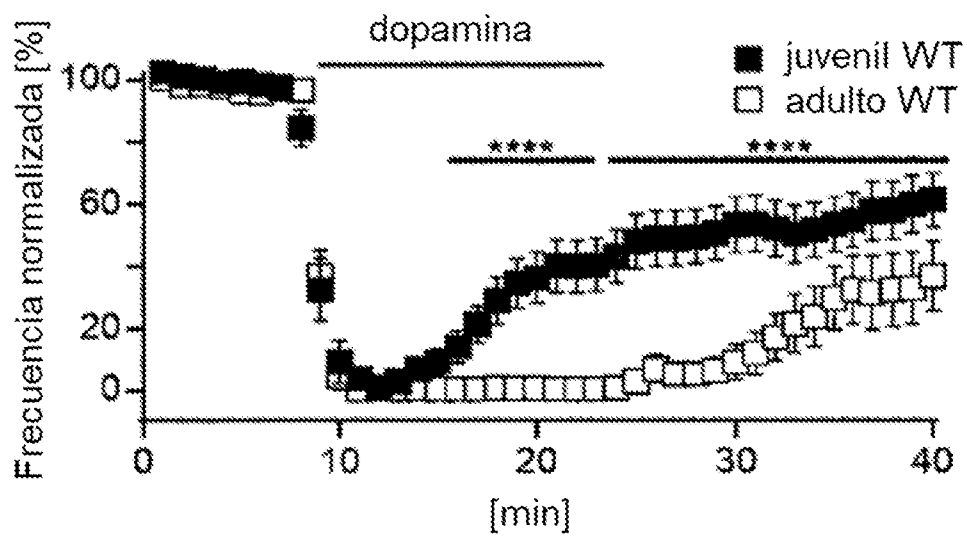


Fig. 1b

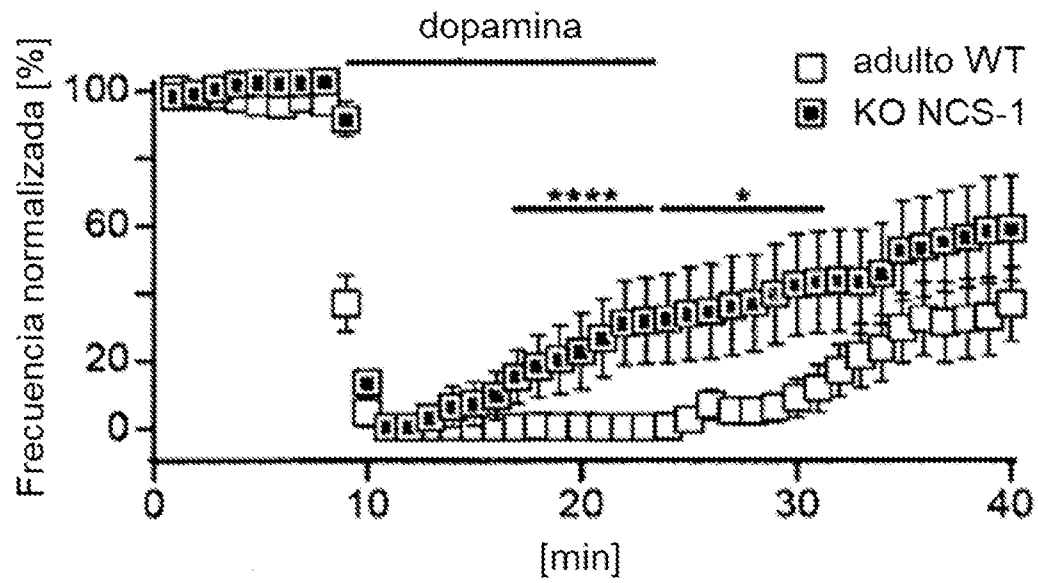


Fig. 1c

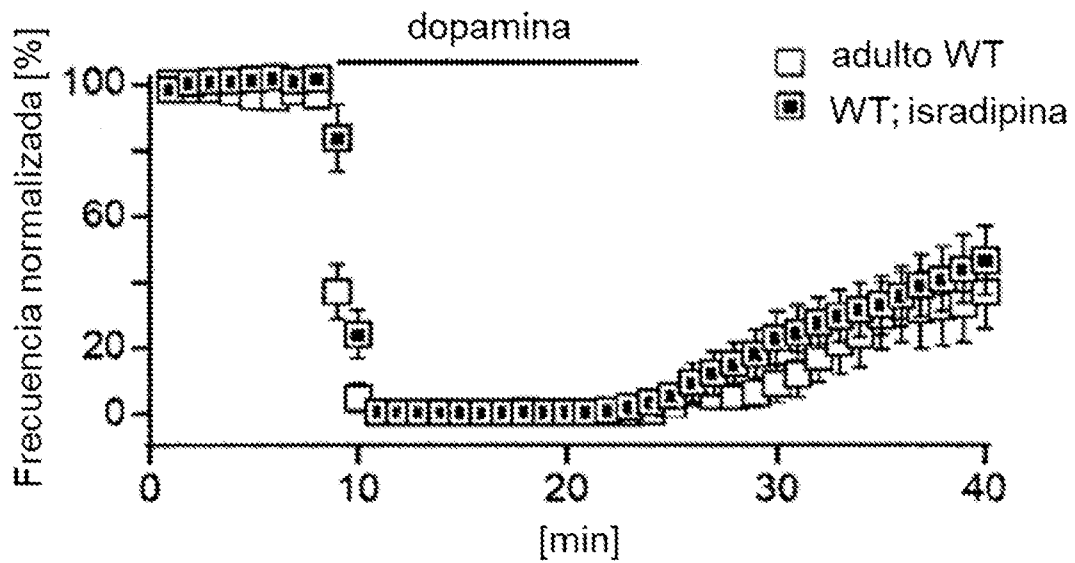


Fig. 1d

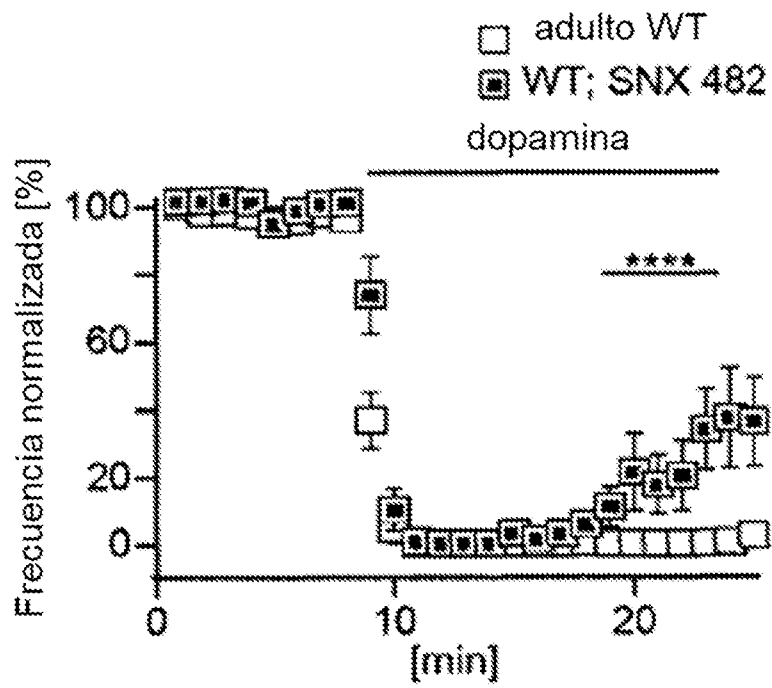


Fig. 1e

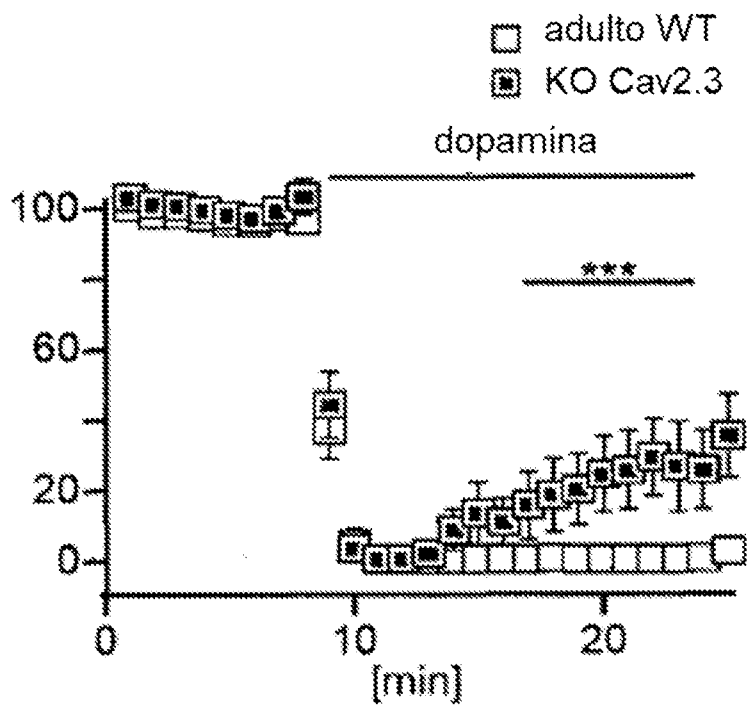


Fig. 1f

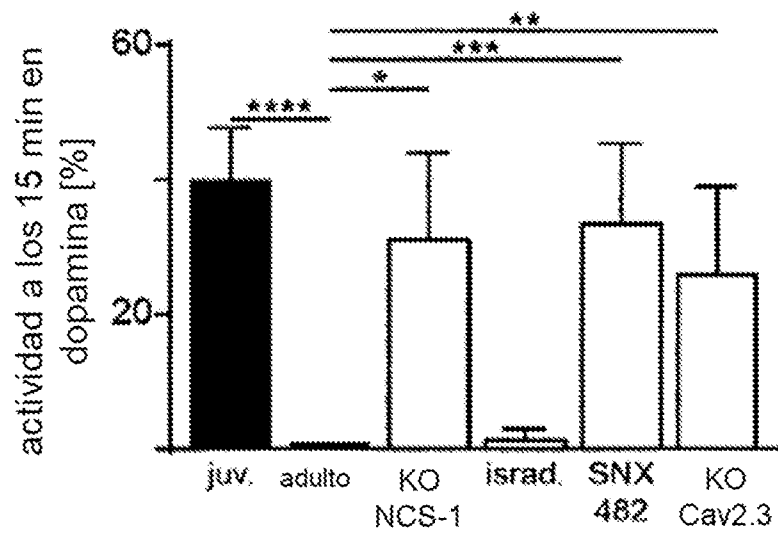


Fig. 1g izquierda

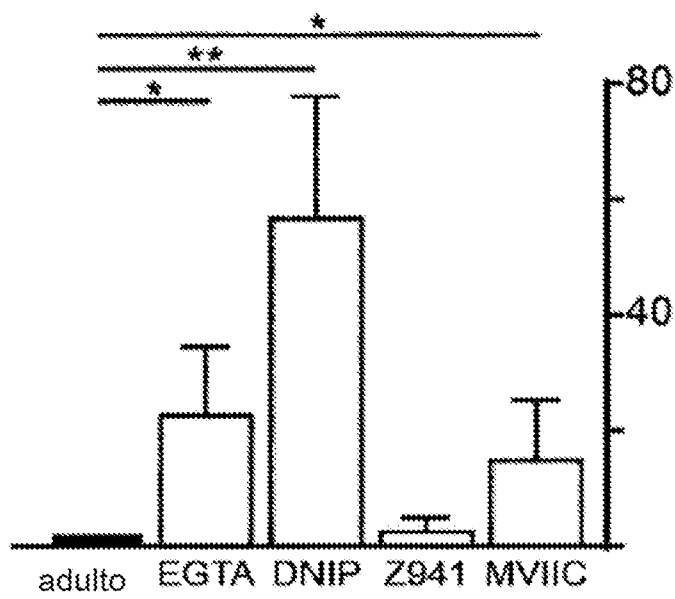


Fig. 1g derecha

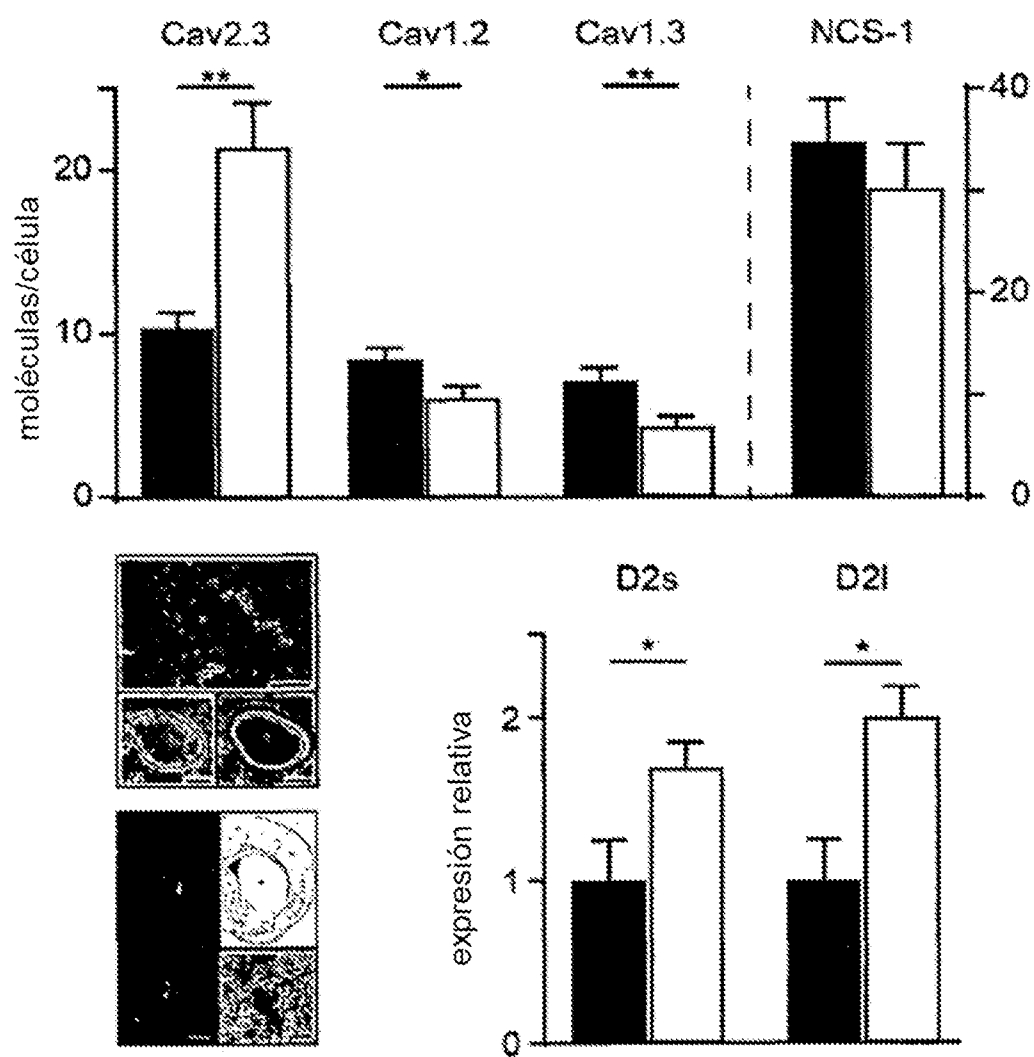


Fig. 1h izquierda

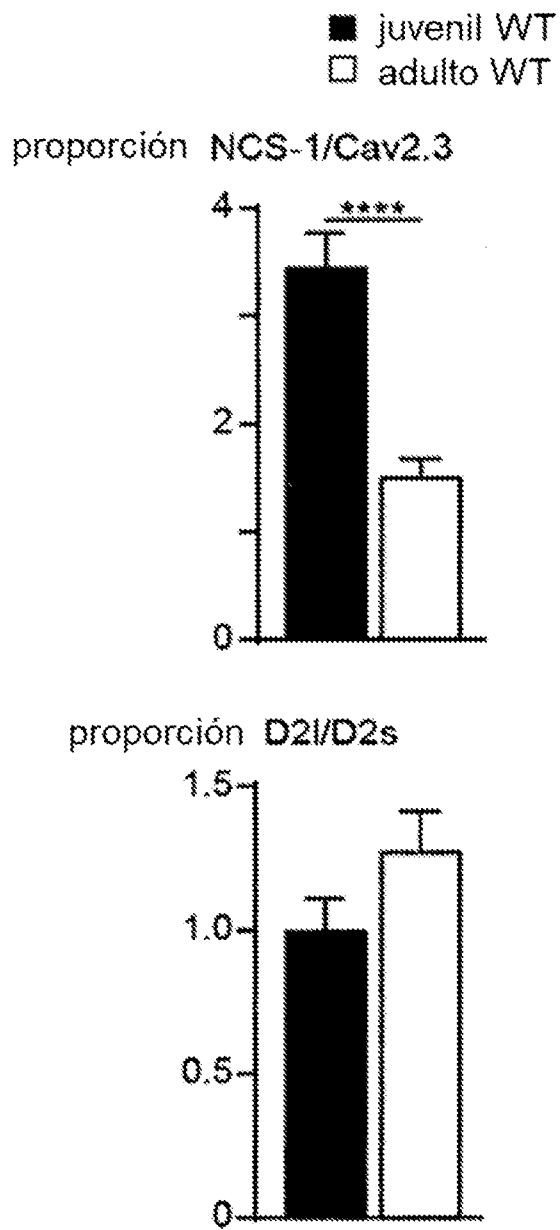


Fig 1h derecha

DA de la SN WT

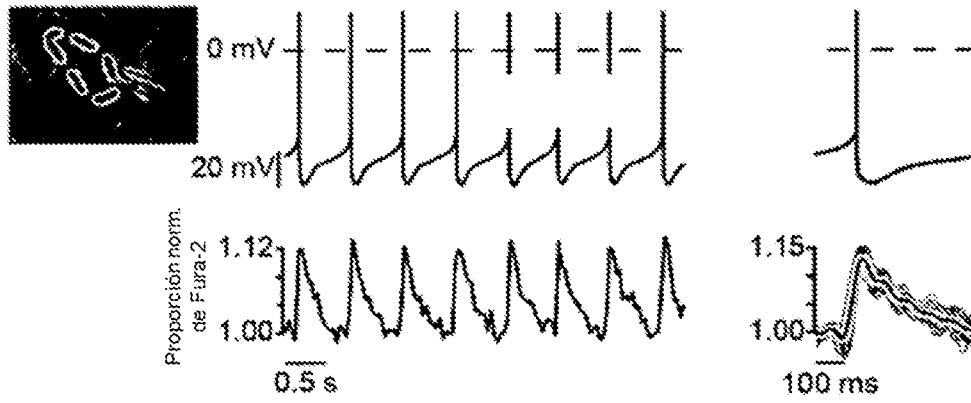


Fig. 2a

DA de la SN KO Cav2.3

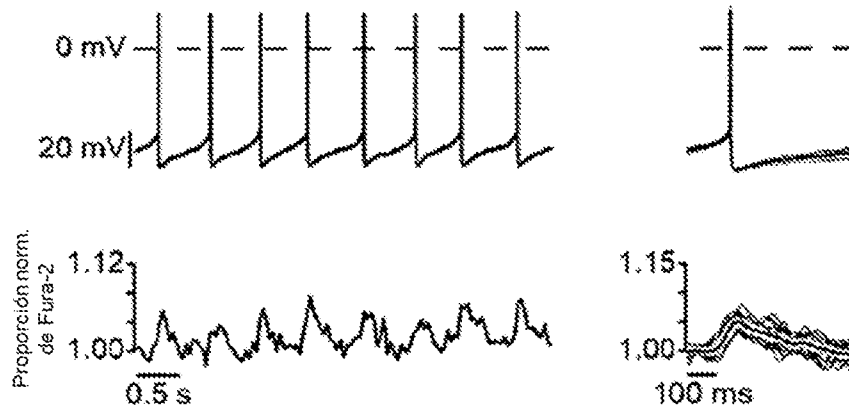


Fig. 2b

DA del VTA WT

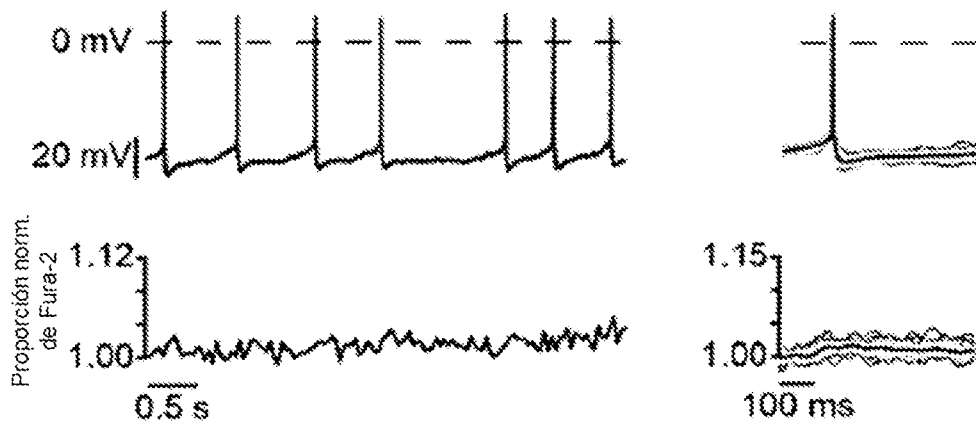
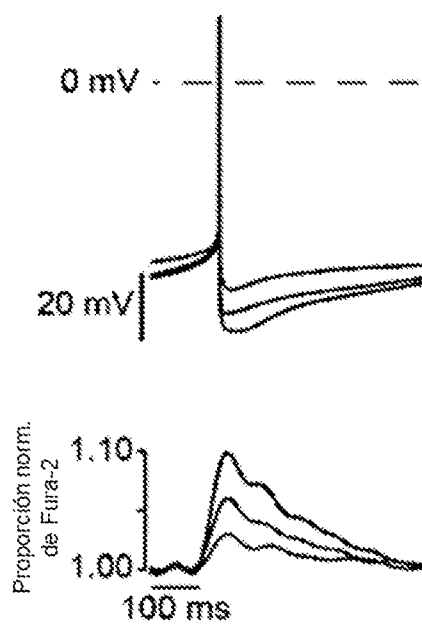


Fig. 2c



DA de la SN WT
DA de la SN KO Cav2.3
DA del VTA WT

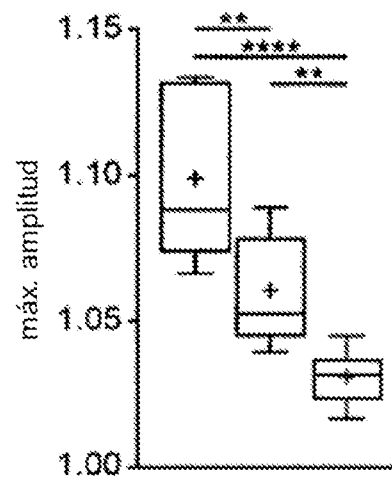


Fig. 2d

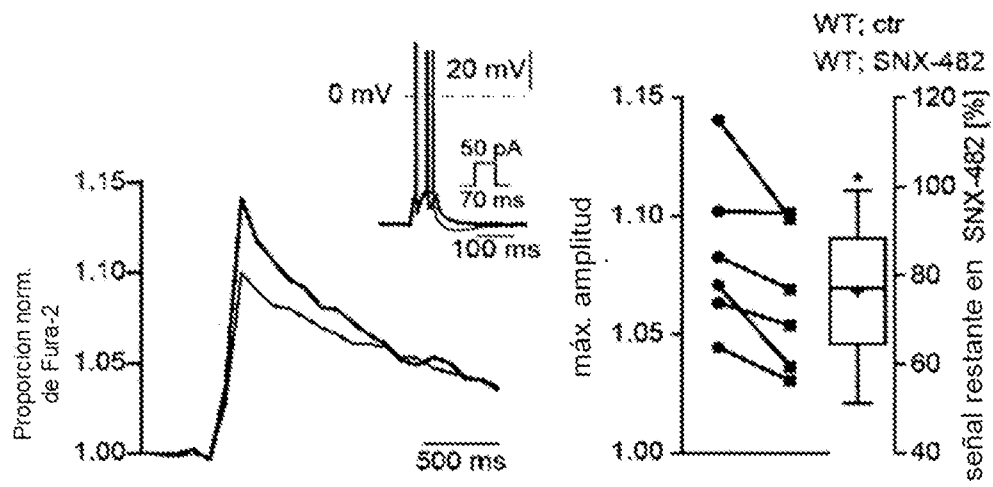


Fig. 2e

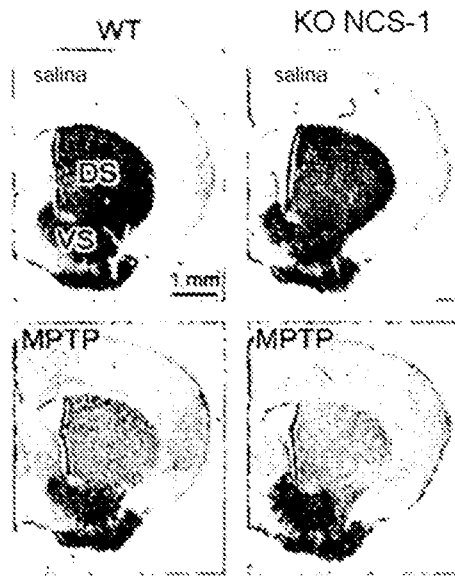


Fig. 3a izquierda

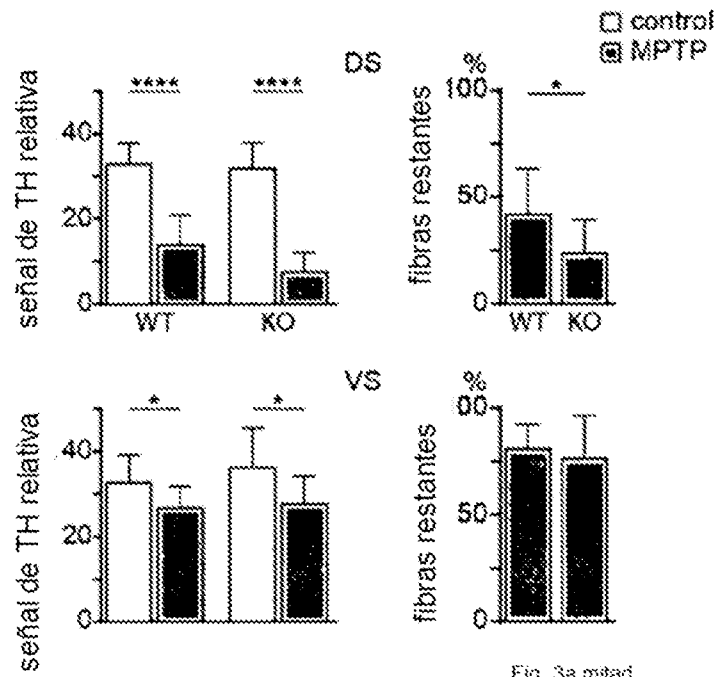


Fig 3a mitad

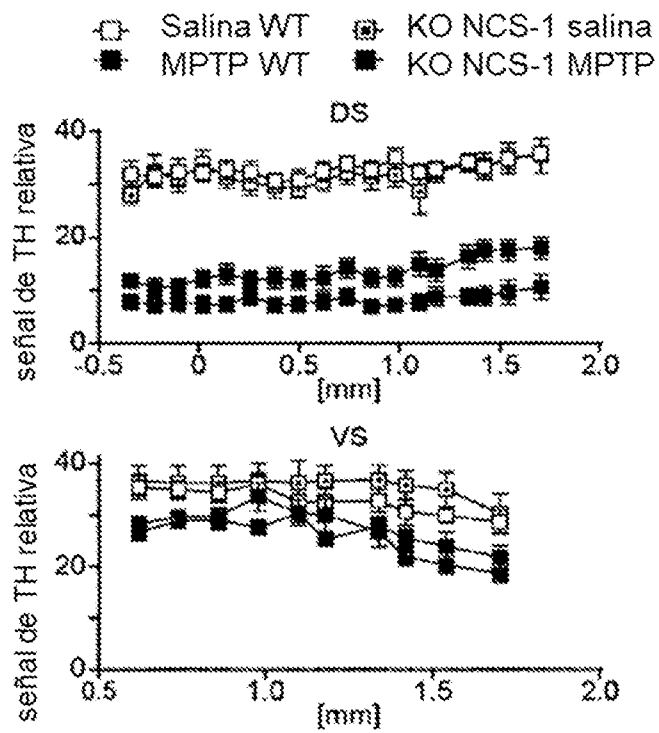


Fig. 3a derecha

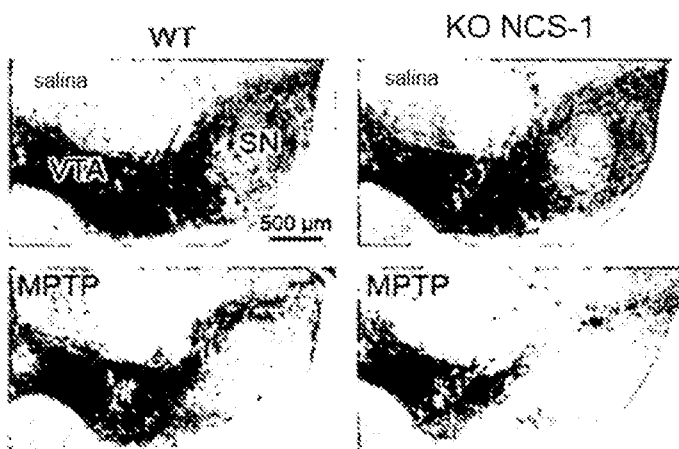


Fig. 3b izquierda

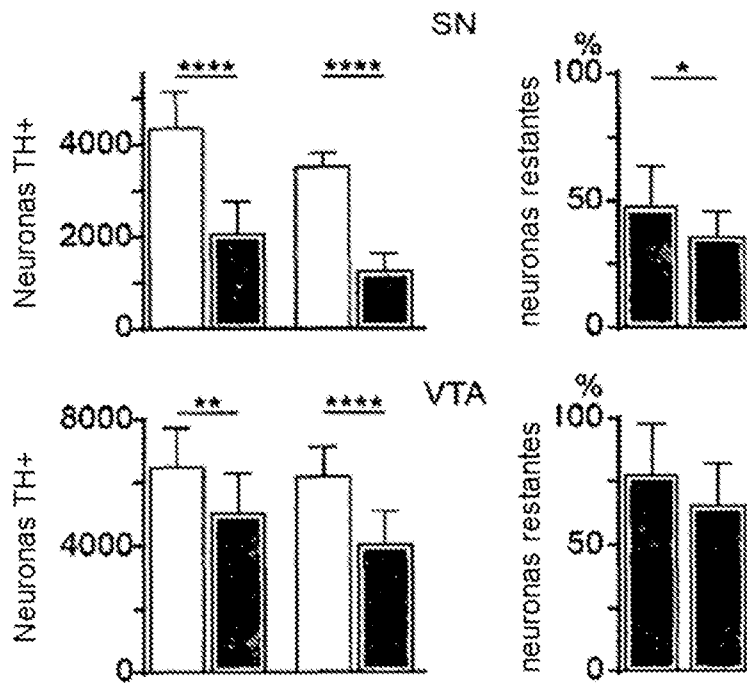


Fig. 3b mitad

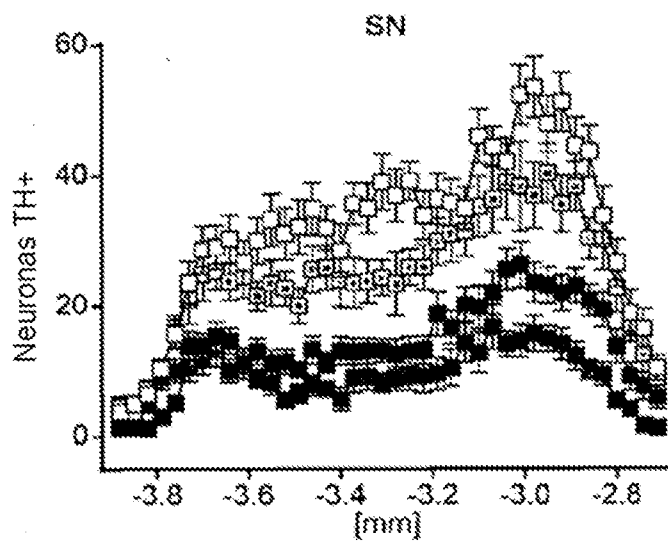


Fig. 3b derecha

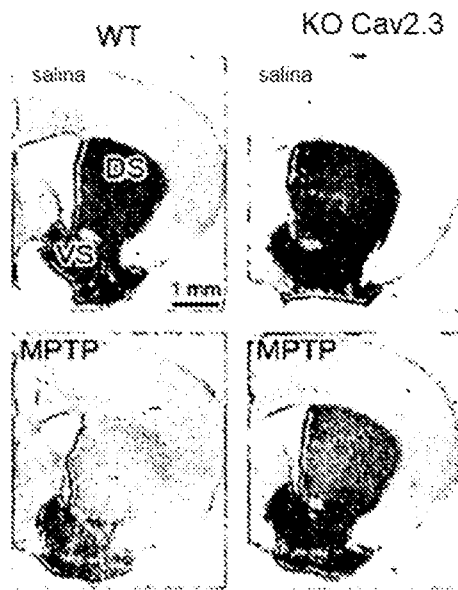


Fig. 3c izquierda

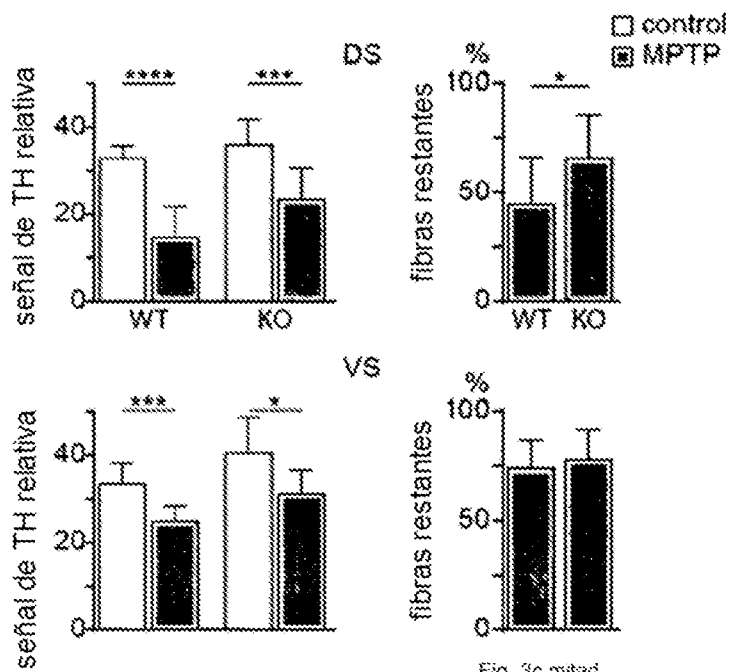


Fig. 3c mitad

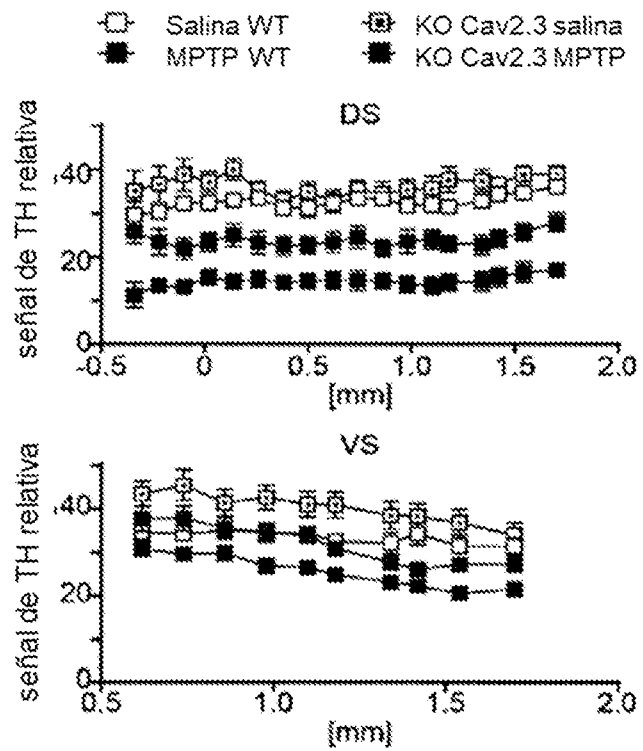


Fig. 3c derecha

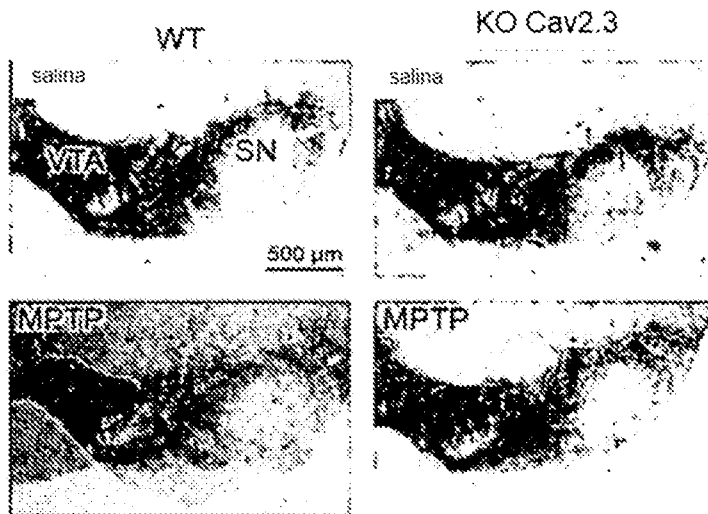


Fig. 3d izquierda

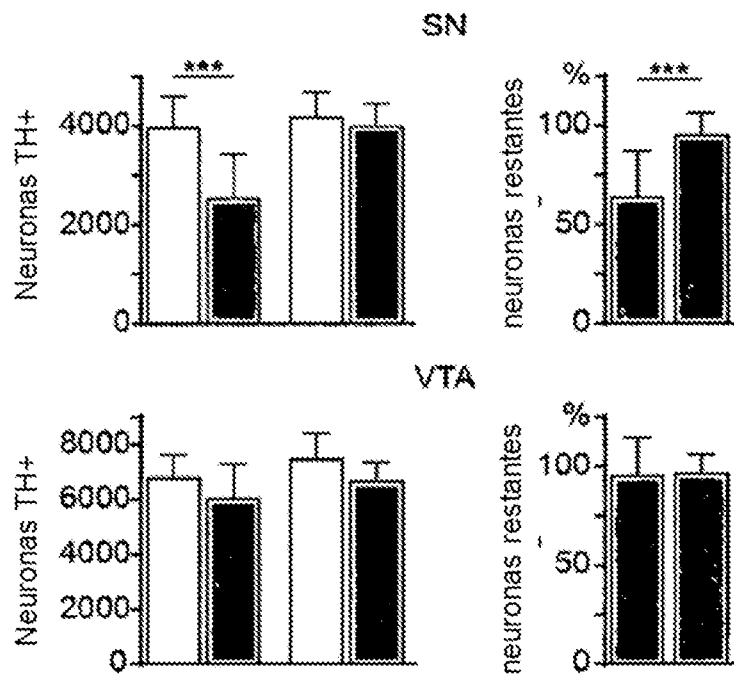


Fig. 3d mitad

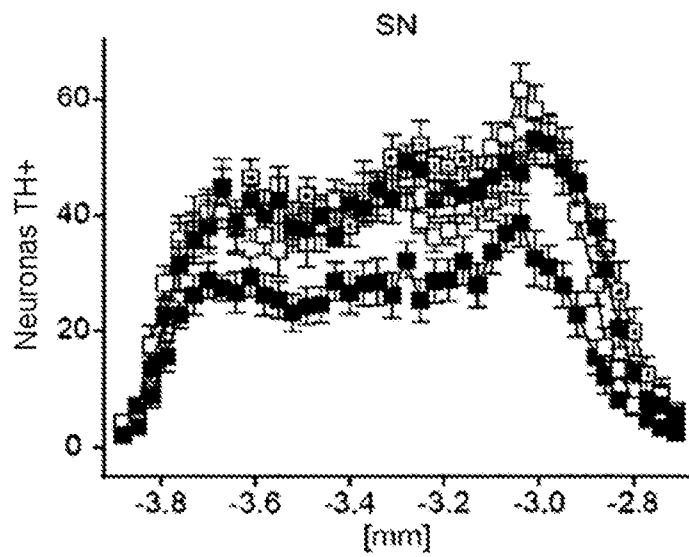


Fig. 3d derecha

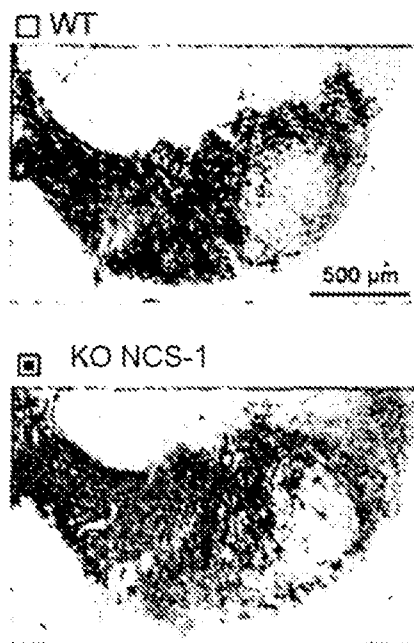
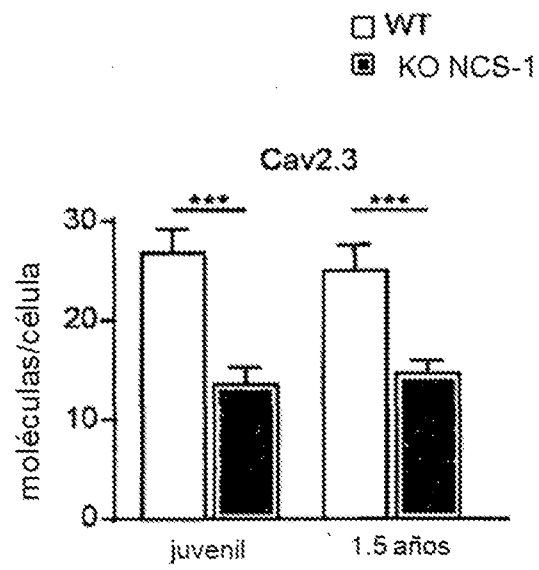


Fig. 4b izquierda

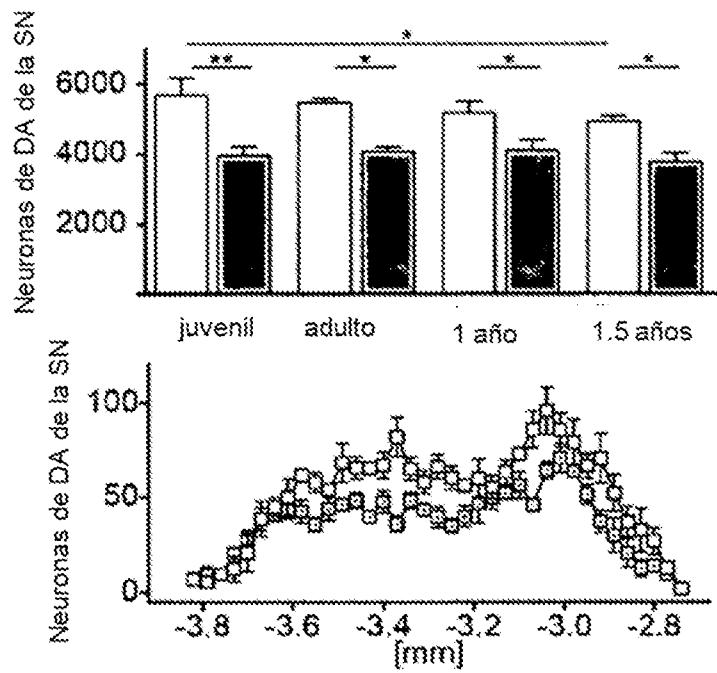


Fig. 4b derecha

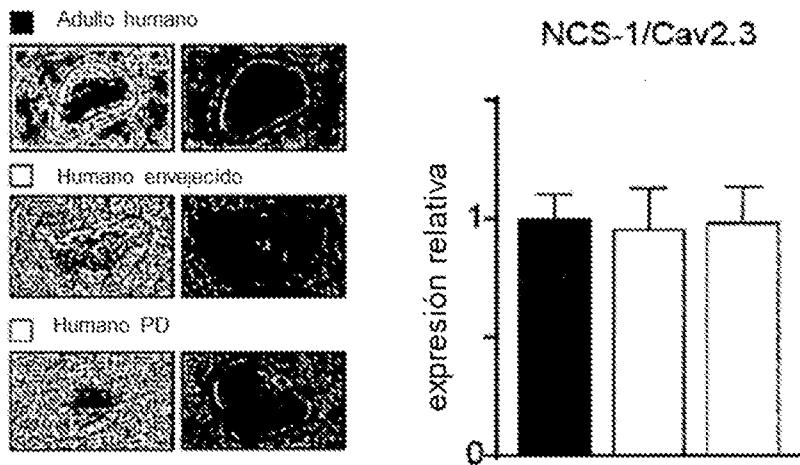


Fig. 4c izquierda

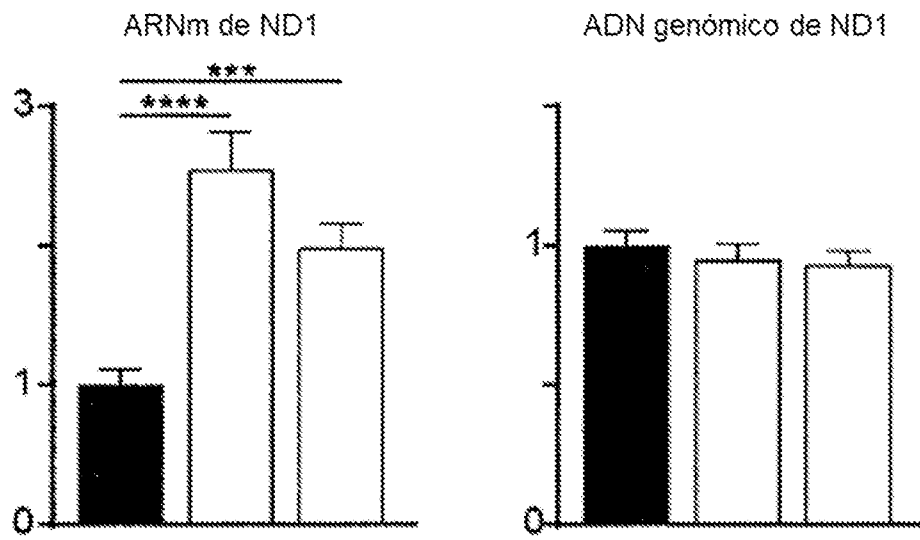


Fig. 4c mitad

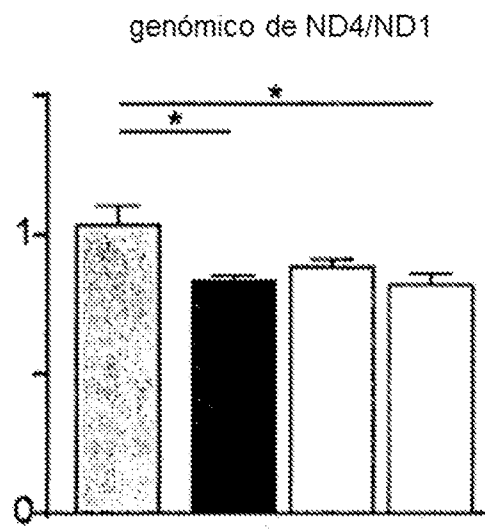


Fig. 4c derecha

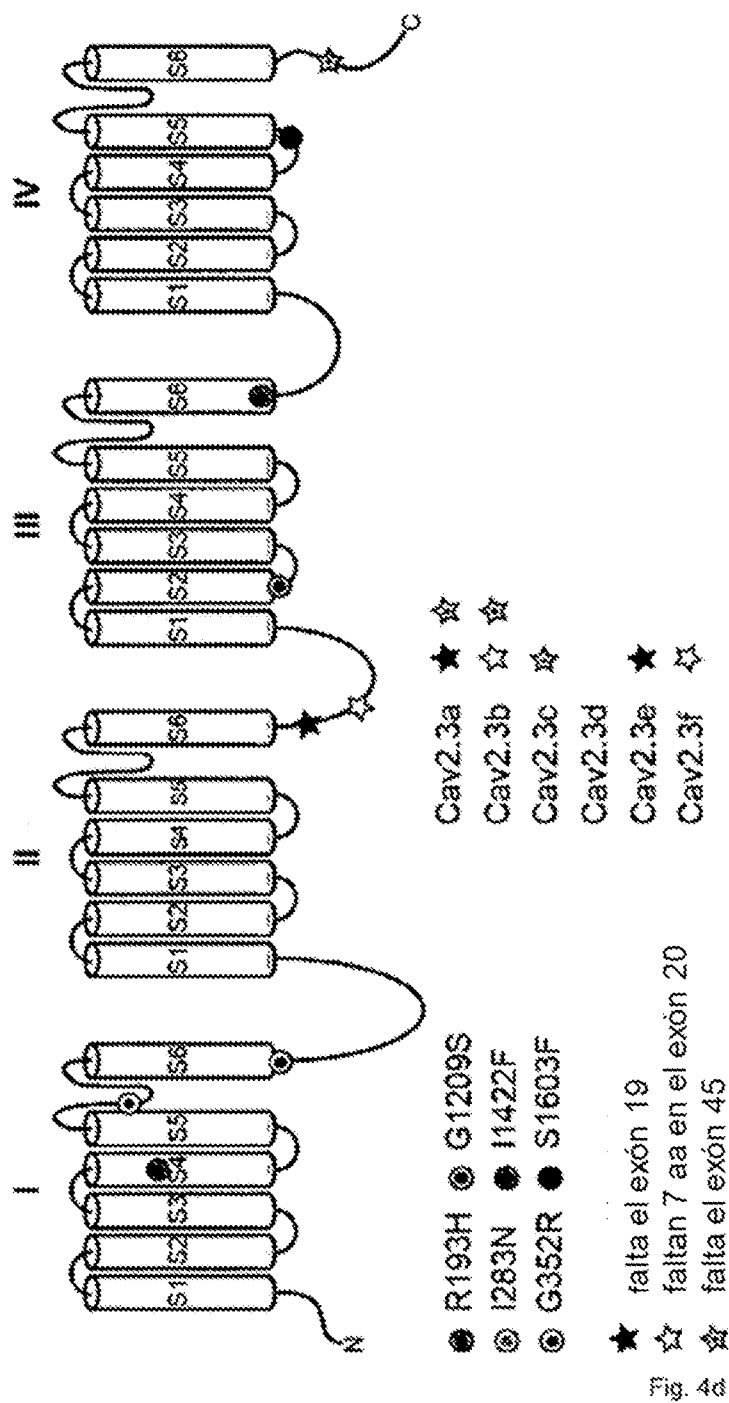


Fig. 4a

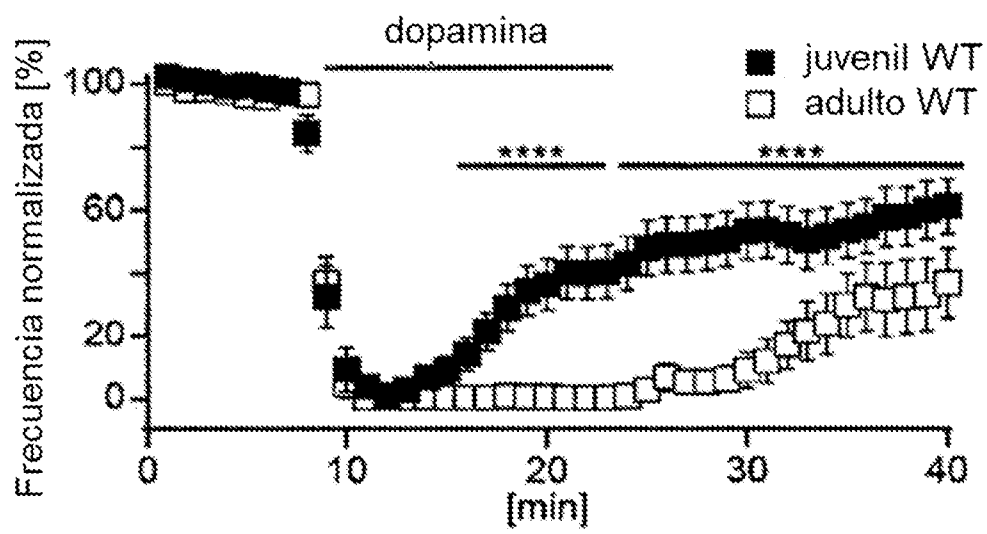


Fig. 5a

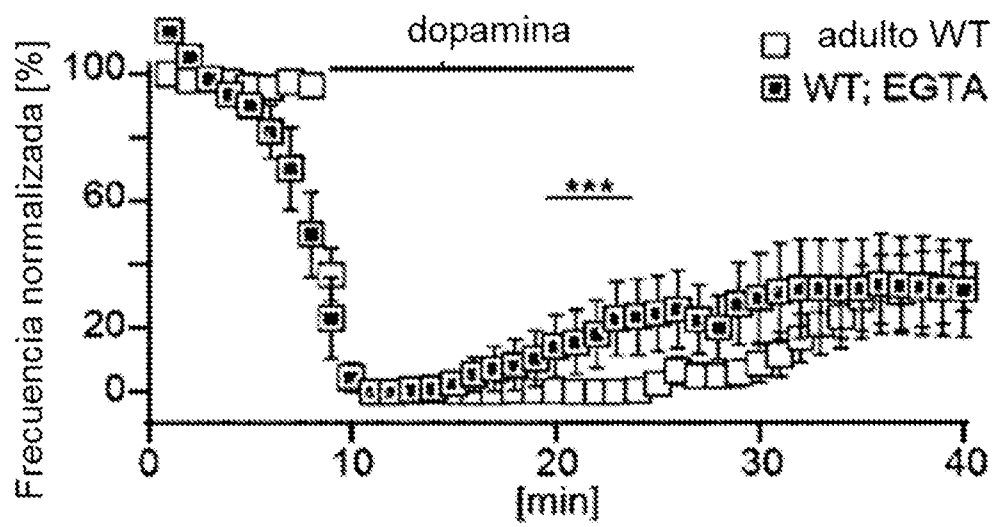


Fig. 5b

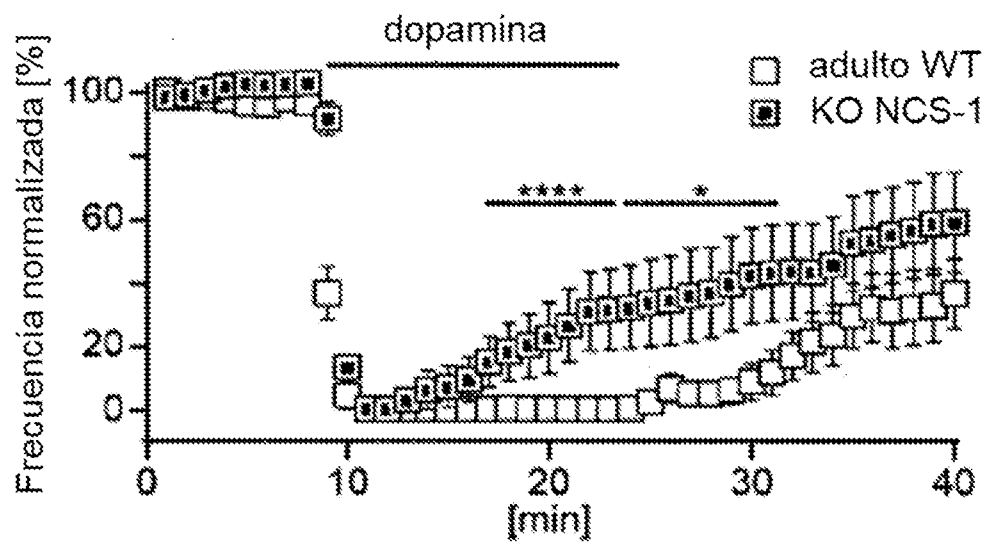


Fig. 5c

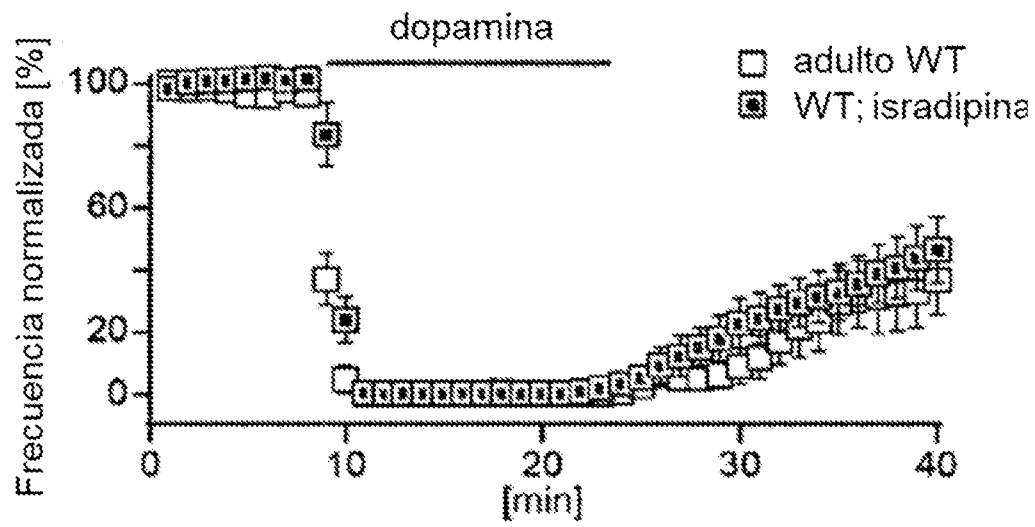


Fig. 5d

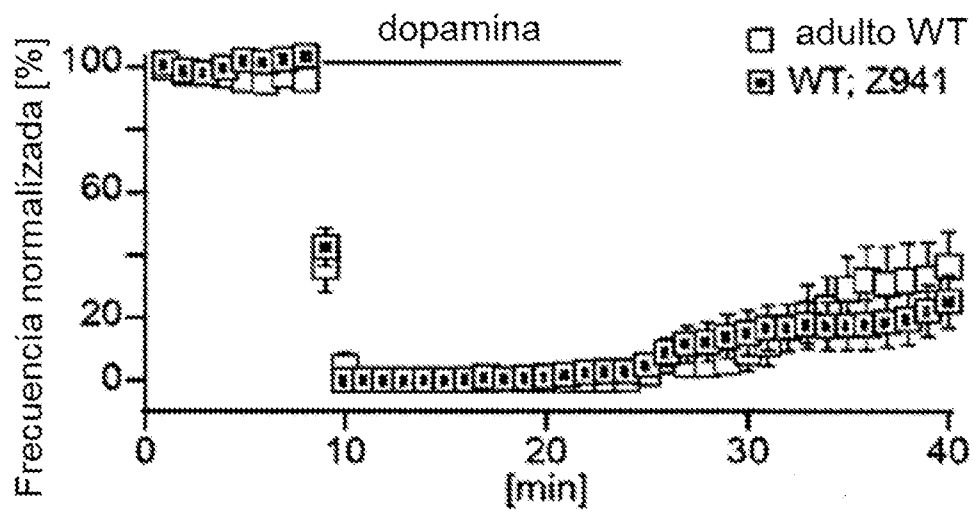


Fig. 5e

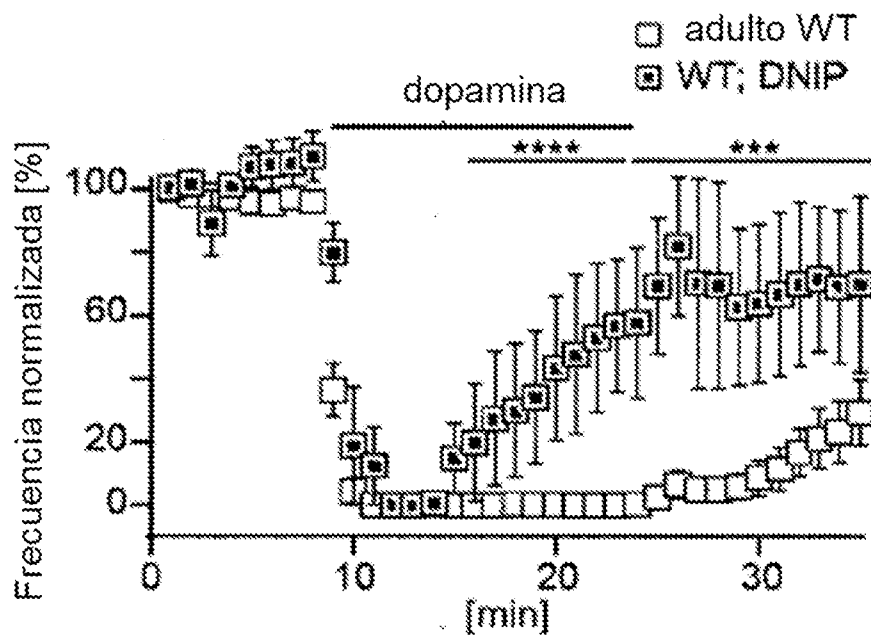


Fig. 5f

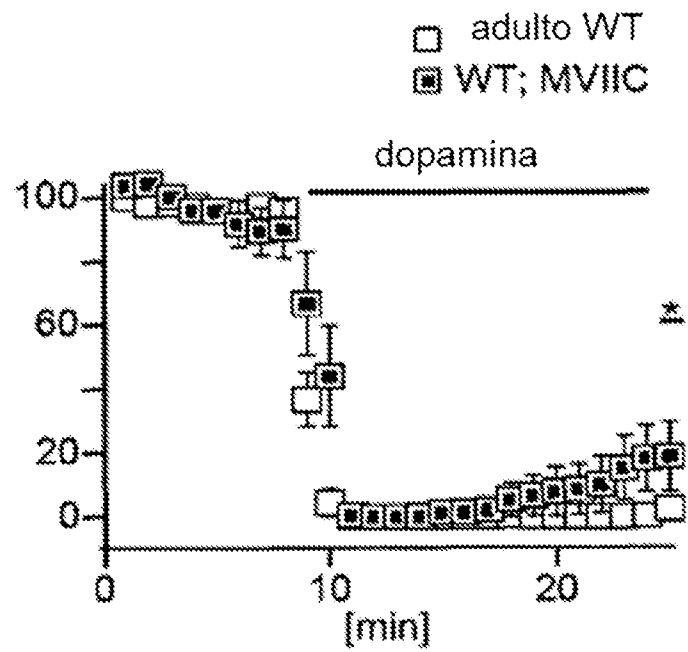


Fig. 5g

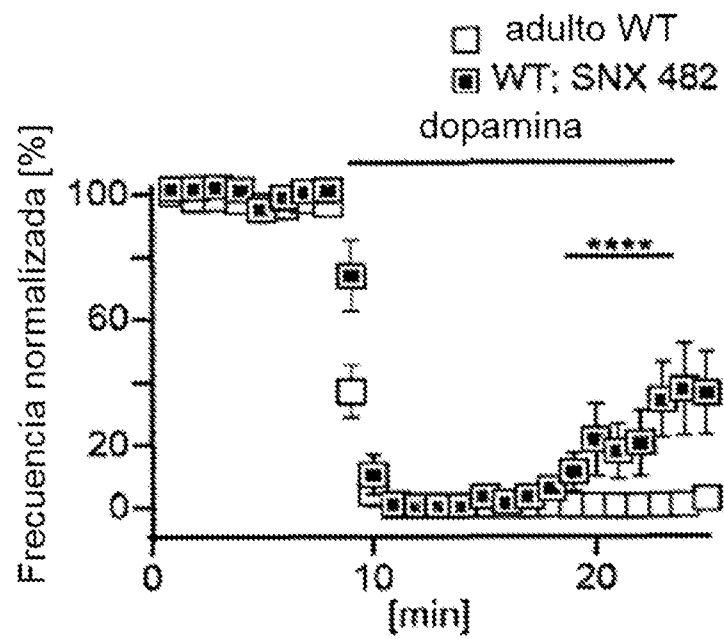


Fig. 5h

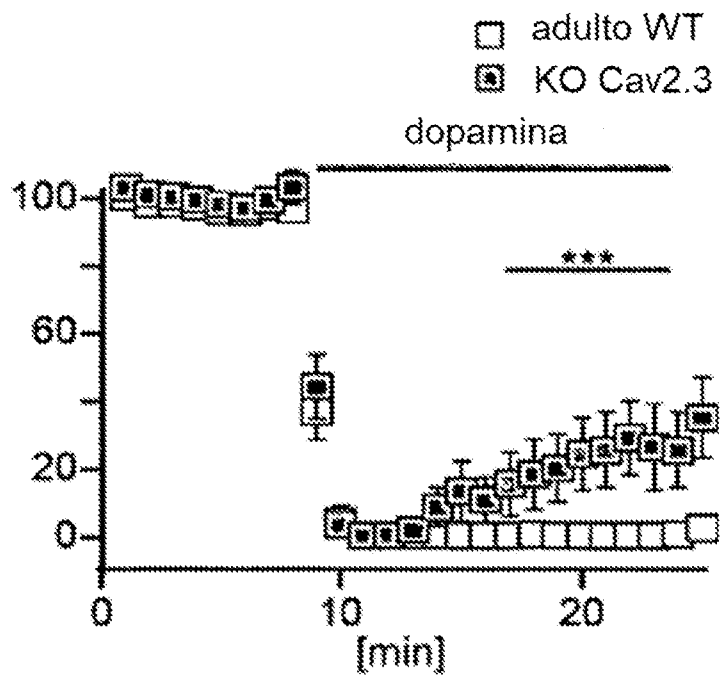


Fig. 5i

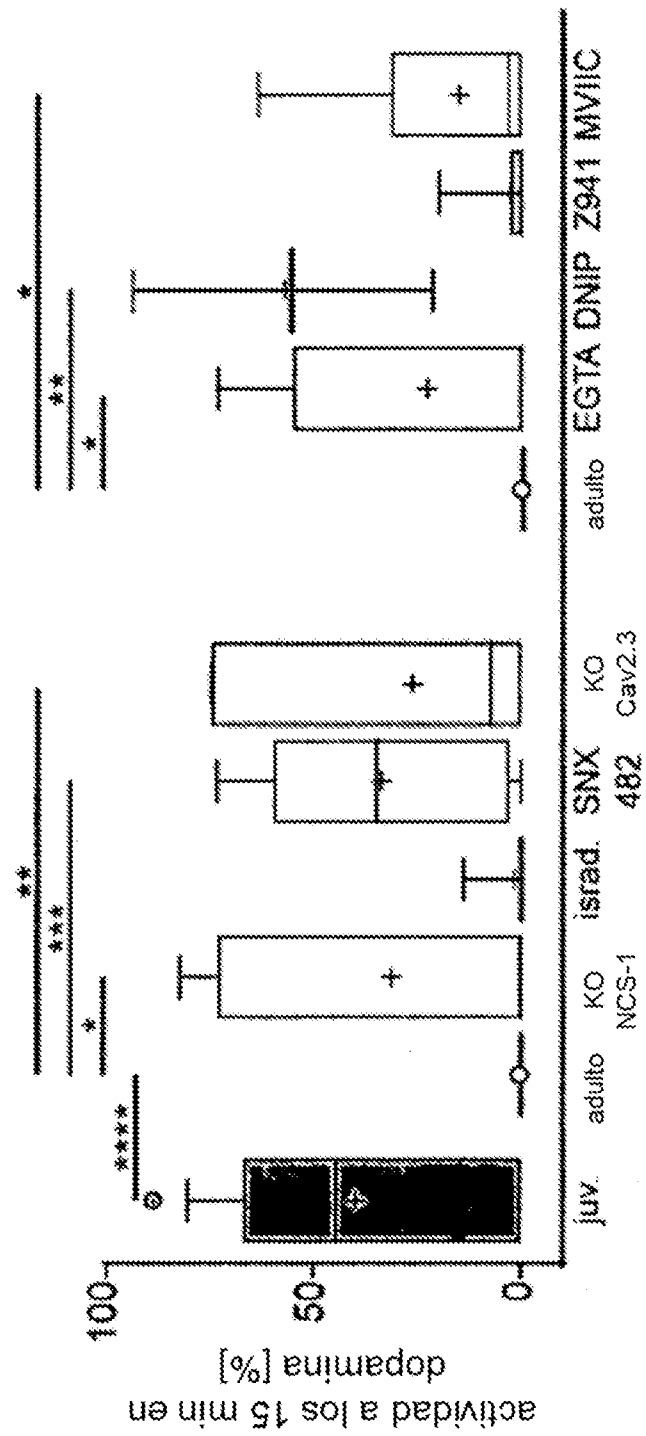


Fig. 5j

■ juvenil WT
□ adulto WT

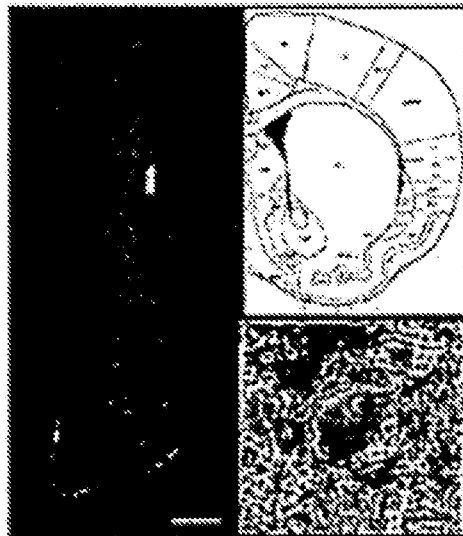
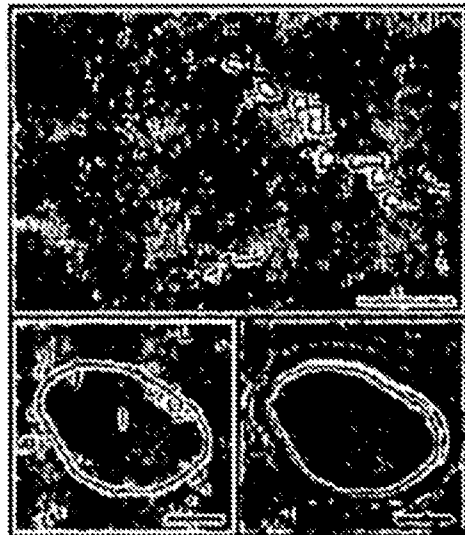


Fig. 5k izquierda

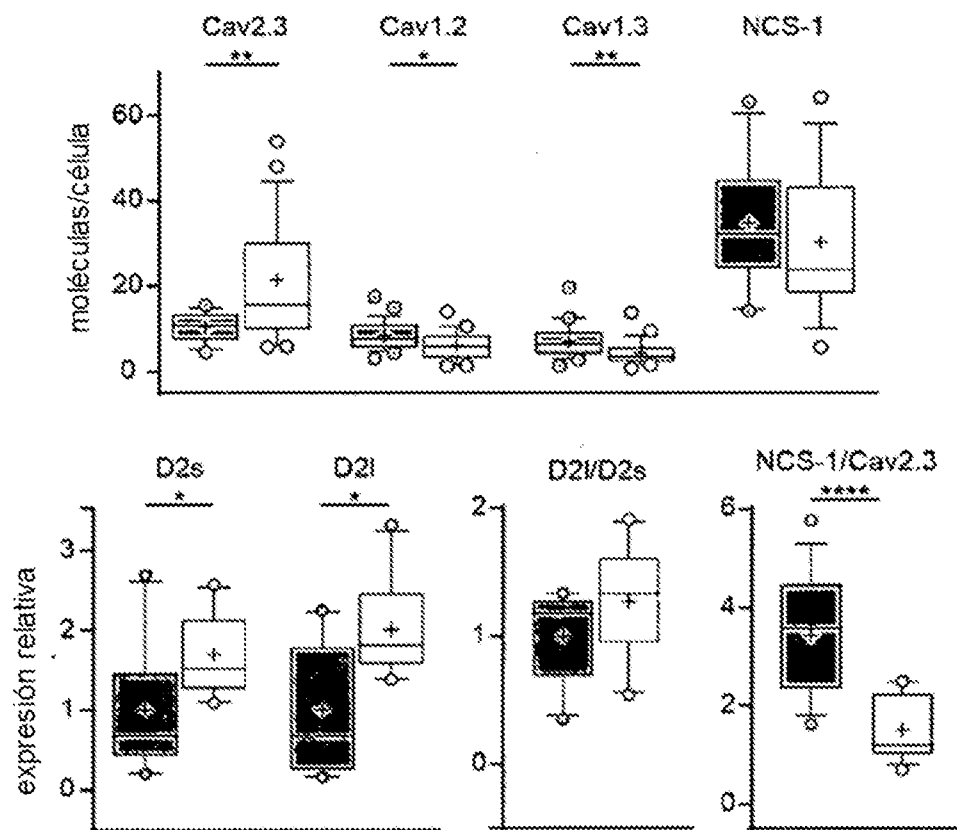


Fig. 5k derecha

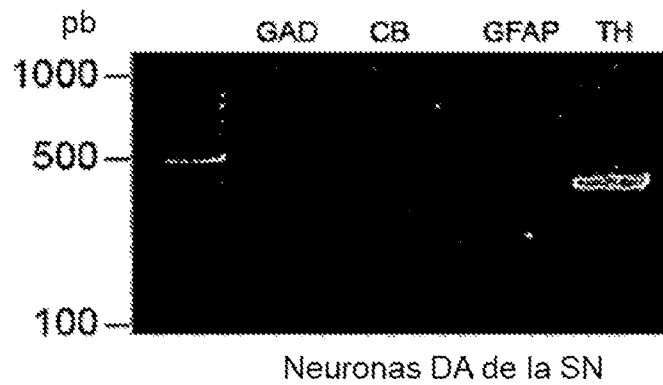


Fig. 5l superior

Variantes de empalme de Cav2.3

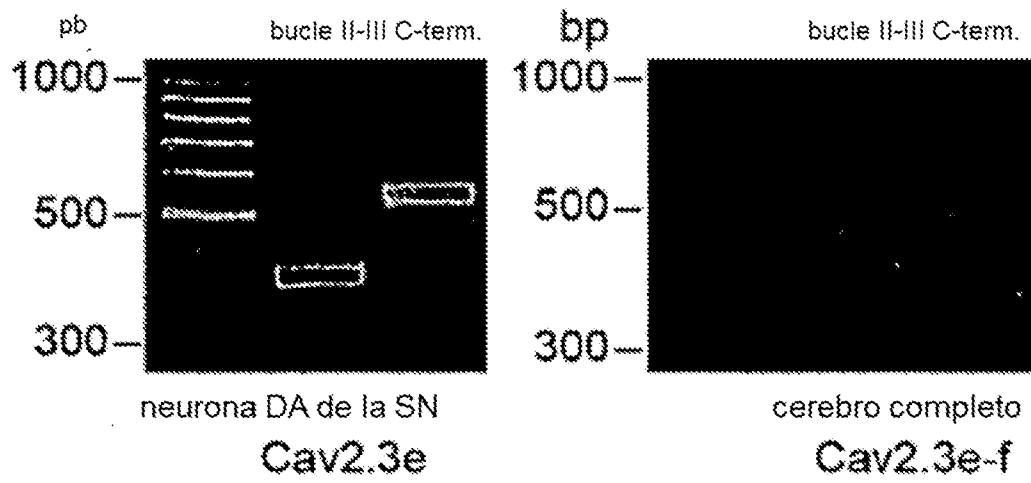


Fig. 5l inferior

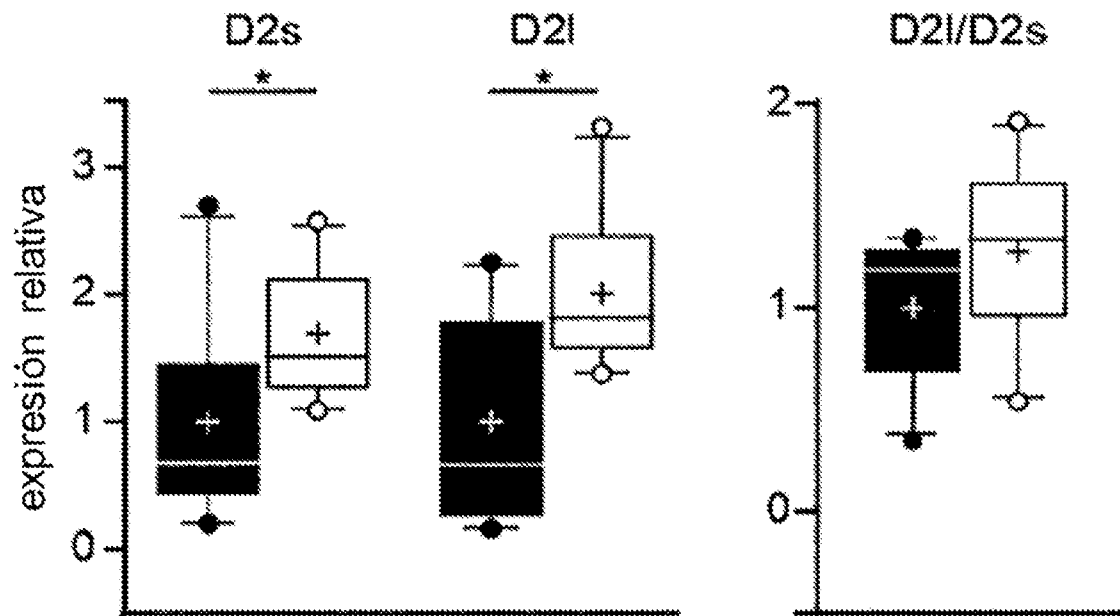


Fig. 5m superior

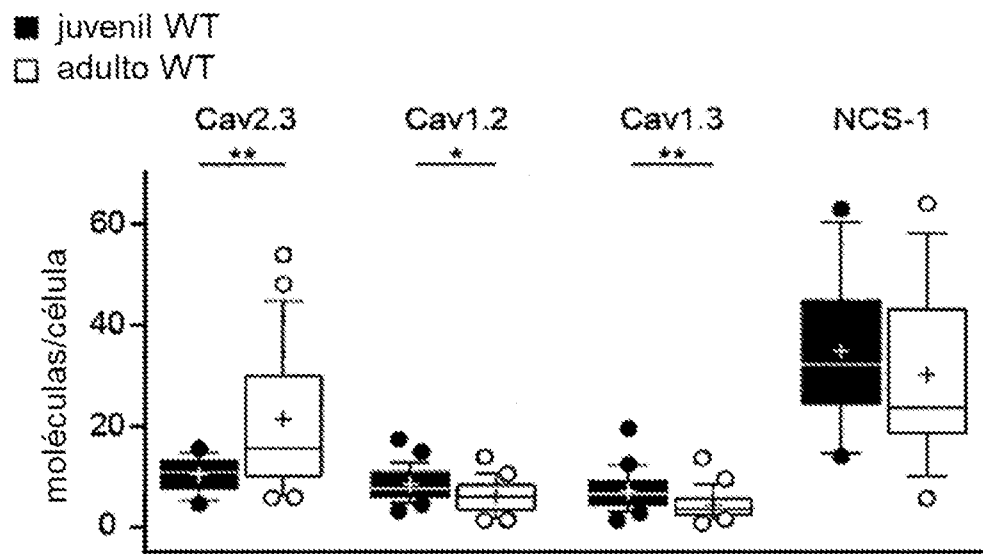


Fig. 5m mitad

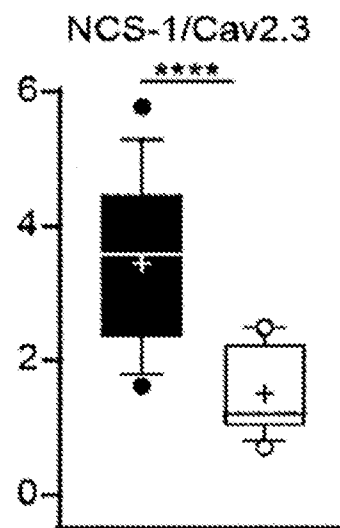


Fig. 5m inferior

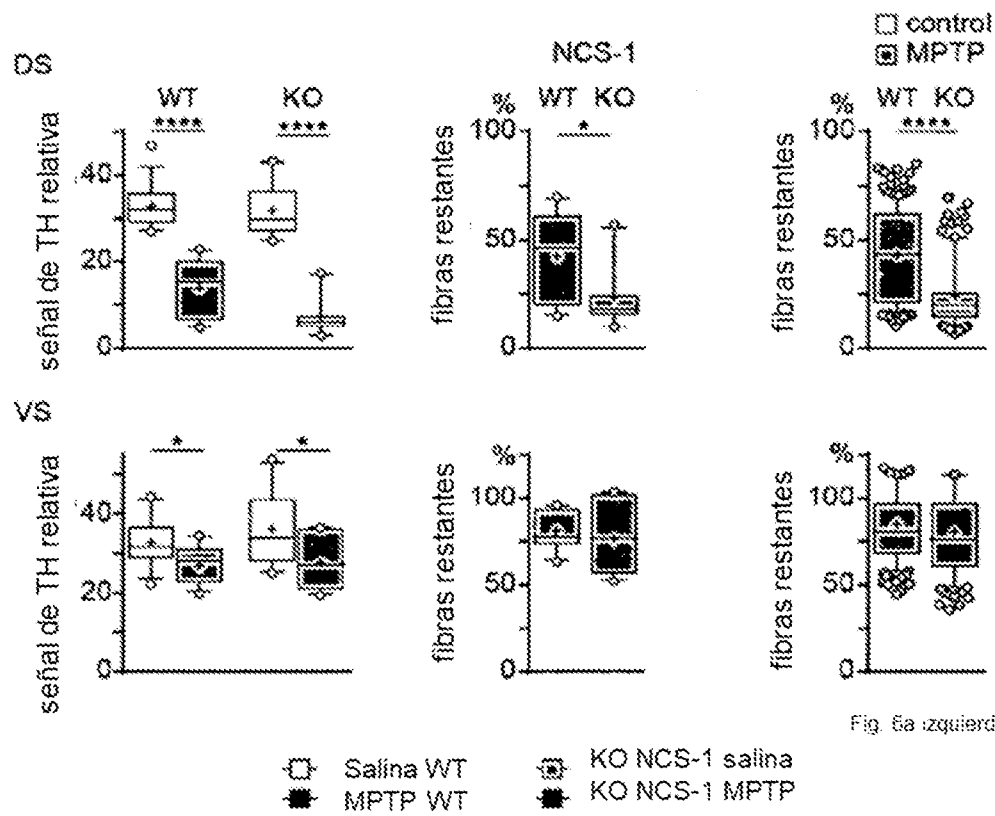


Fig. 6a izquierda

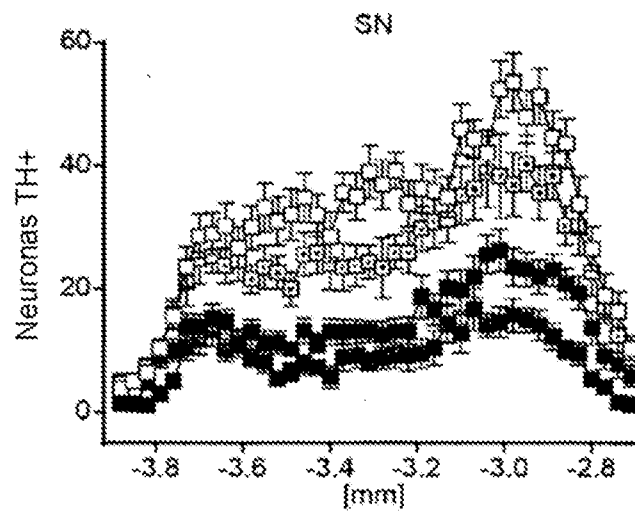


Fig. 6a derecha

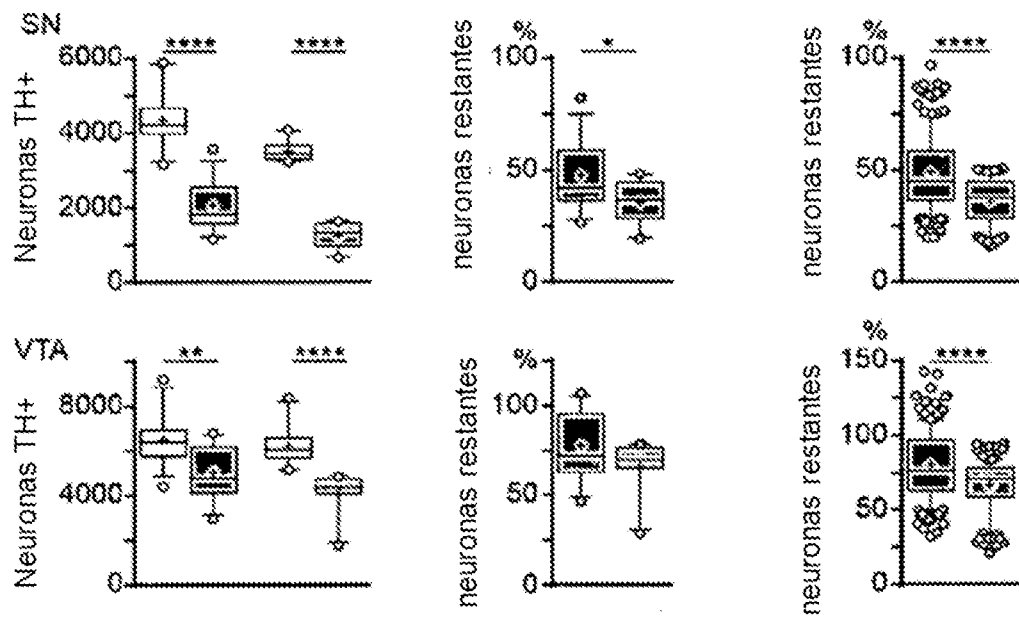


Fig. 6b izquierda

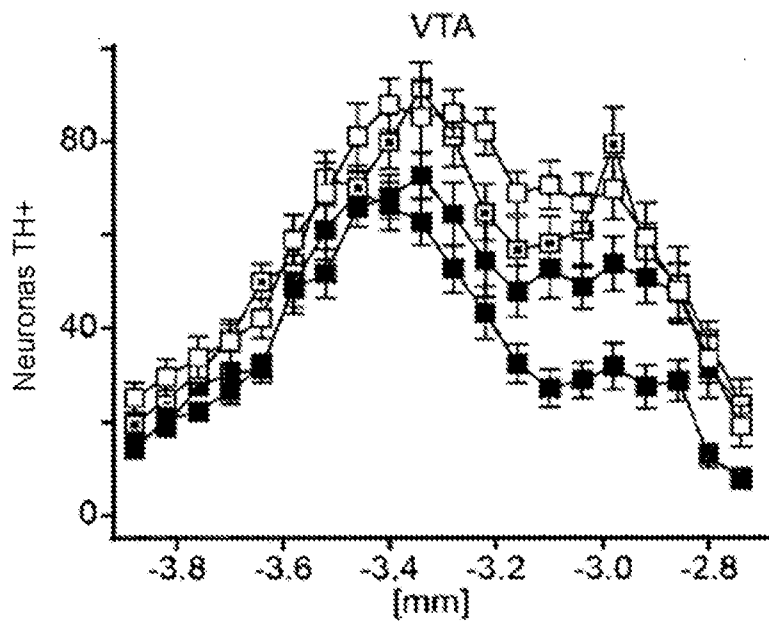


Fig. 6b derecha

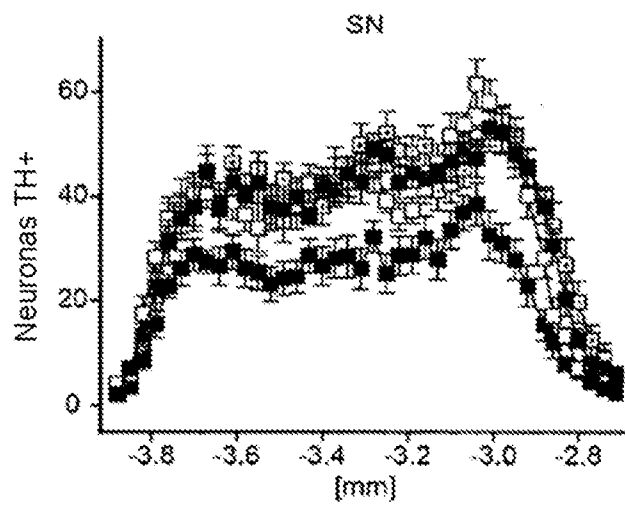
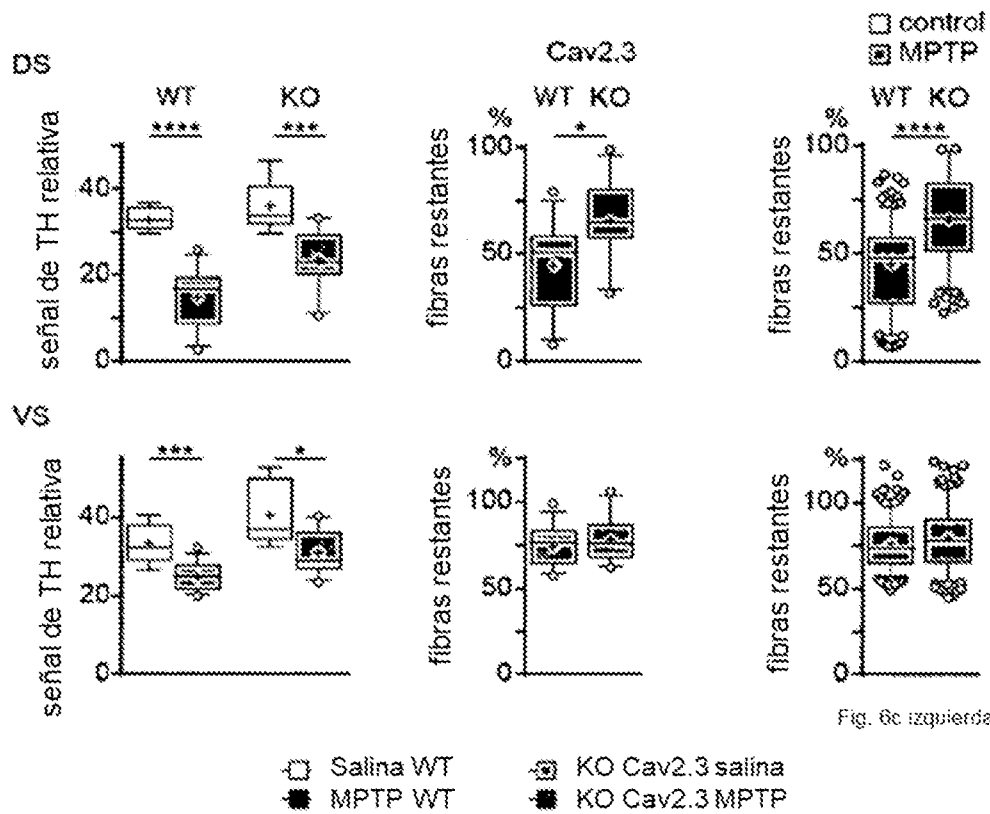


Fig. 6c derecha

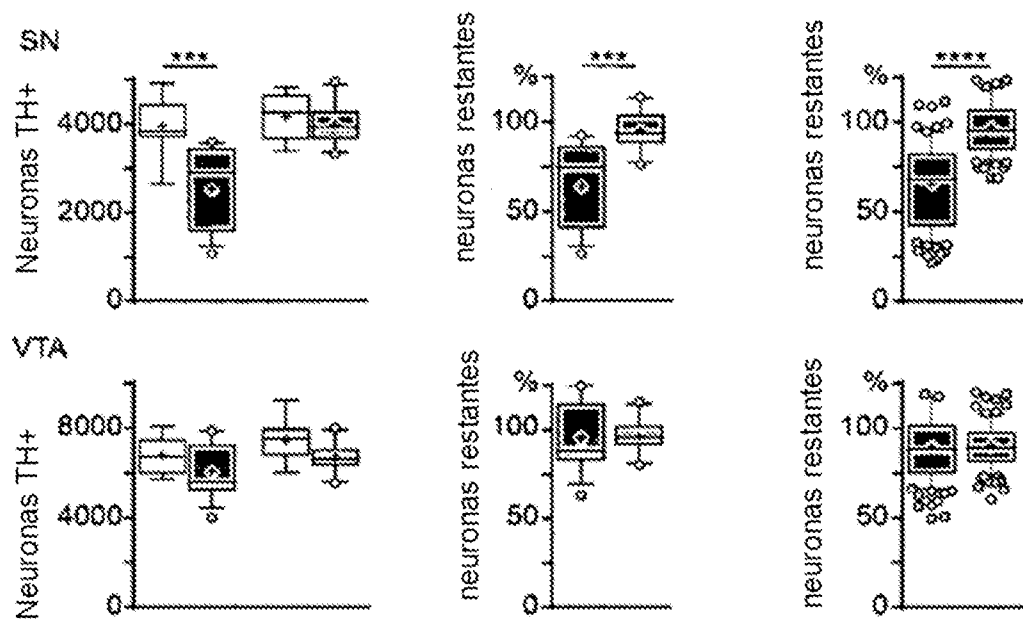


Fig. 6d izquierda

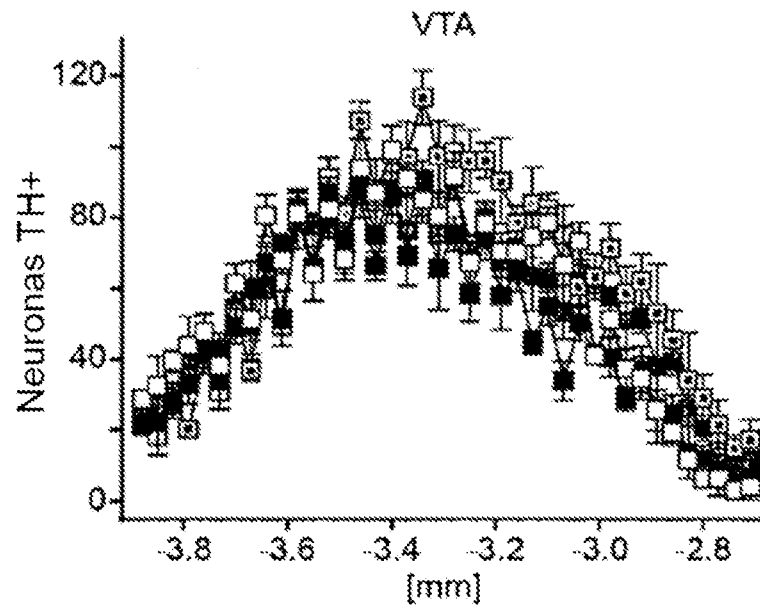


Fig. 6d derecha

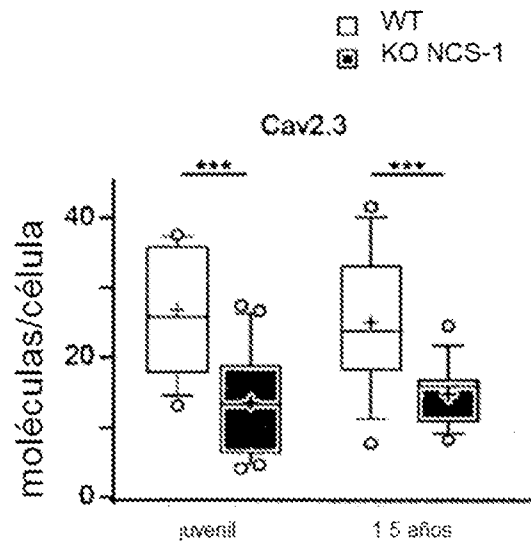


Fig. 7a

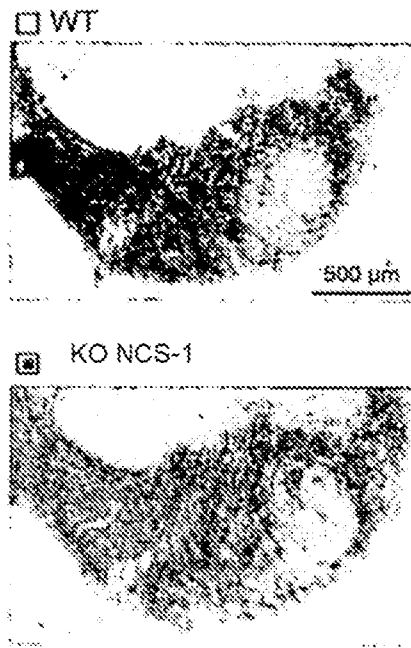


Fig. 7b izquierda

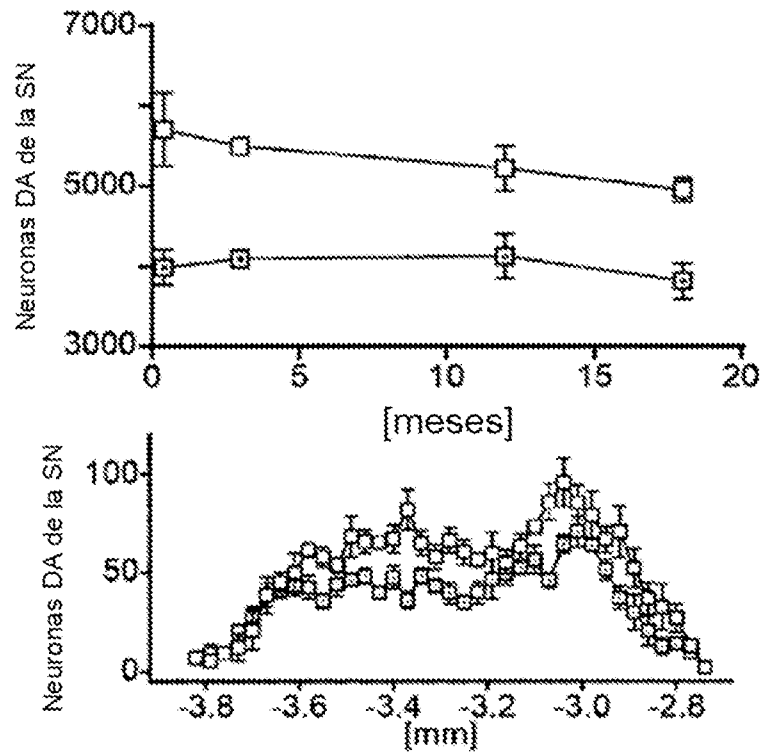


Fig. 7b derecha

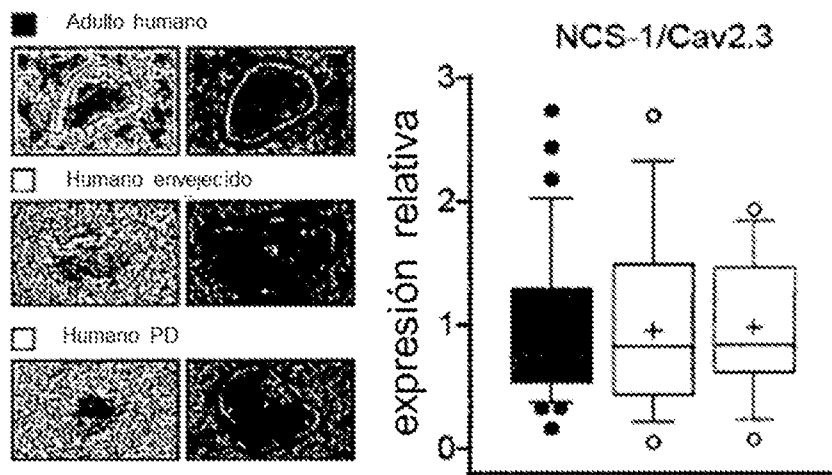


Fig. 7c izquierda

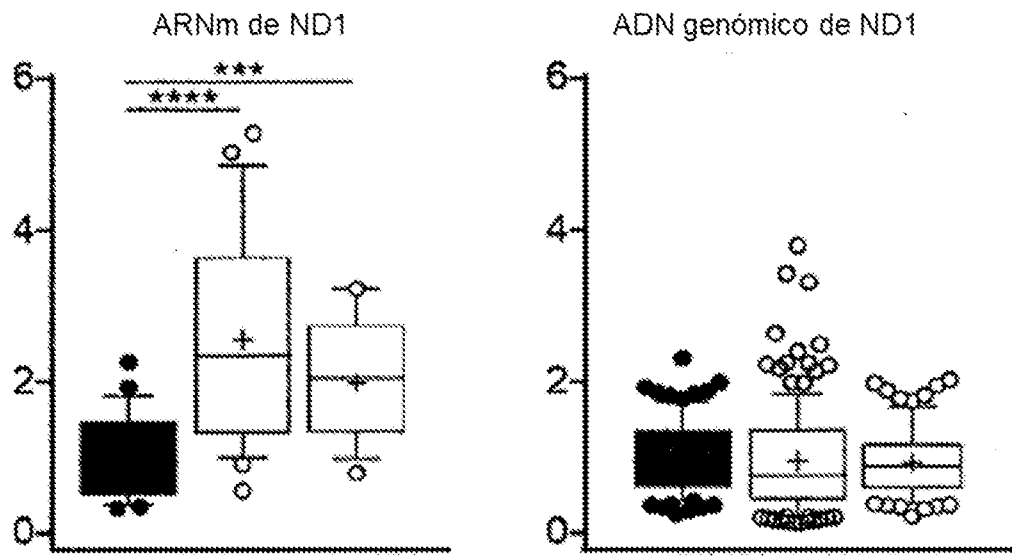


Fig. 7c mitad

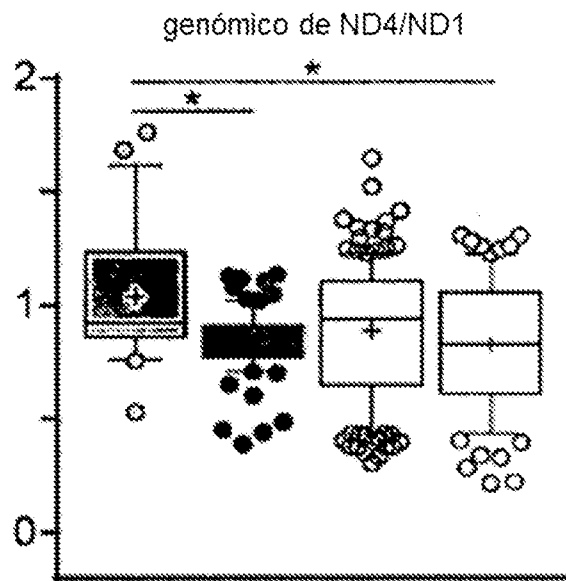


Fig. 7c derecha

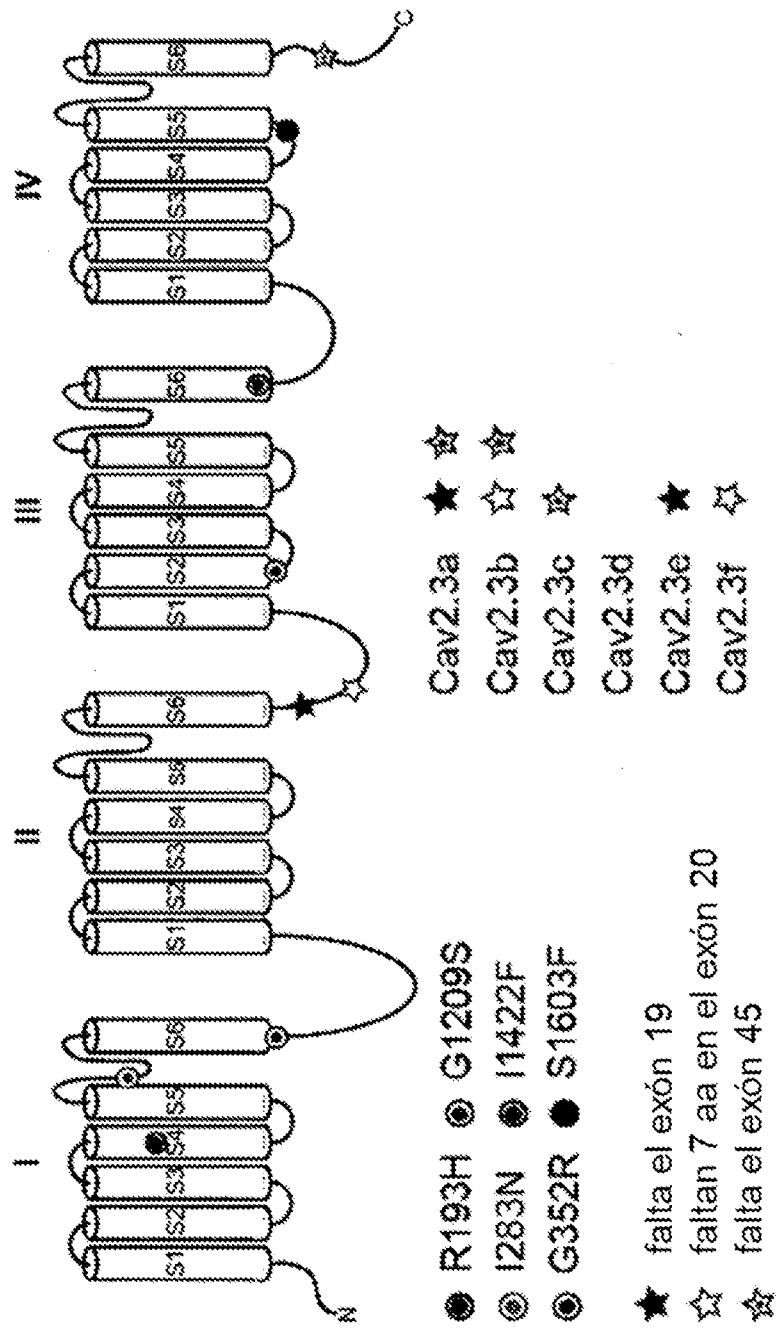


Fig. 7a superior

MS4		
R193HH.....	205
CACNA1E	DLRTLRAVRVLRPLKLVSGIP	205
CACNA1A	210
CACNA1B	207
CACNA1S	.VKA...F.....R...V.	180
CACNA1C	.VKA...F.....R...V.	258
CACNA1D	.VKA...F.....R...V.	255
CACNA1F	.VKA...F.....R...V.	221

MS2		
G1209SS.....	1219
CACNA1E	EMVIKMIDQGLILQDGSYFR	1219
CACNA1AL..V.HQ.A...	1313
CACNA1BL..L.HP.A...	1216
CACNA1S	.I.L..TTY.AF.HK..FC.	865
CACNA1C	.IIL..TAY.AF.HK..FC.	986
CACNA1D	.ILL..TTF.AF.HK.AFC.	972
CACNA1F	.ILL..TVF.AF.HR..FC.	937

Fig. 7d izquierda inferior

	poro	
I283NN.....	297
CACNA1E	ECK-DWIGPNDGITQFDN1LF	297
CACNA1A	K.QPY.E...N.....	306
CACNA1B	..REY.P...F...N.....	302
CACNA1S	..RGG.P...H...H...FG.	280
CACNA1C	V..PG.D..KH...N...FA.	351
CACNA1D	..RSG.V...G...N...FA.	352
CACNA1F	..RGR.P...G...N...FF.	318
	MS6	
I1422FF.....	
CACNA1E	FFV....ALIIITFQEQGD	1431
CACNA1A	1522
CACNA1B	1424
CACNA1S	..MM....GEV.V.....E	1071
CACNA1C	..MM....GEV.V.....E	1192
CACNA1D	..MM....GEV.V.....E	1178
CACNA1F	..MM....GEV....RA..E	1143

Fig. 7d mitad inferior

	IS6	
G352RR.....	362
CACNA1E	LNLVLGVLSGEFAKERERVE	362
CACNA1A	372
CACNA1B	368
CACNA1ST....KAK	345
CACNA1CS....KAK	414
CACNA1DS....KAK	415
CACNA1FS....KAK	383

	IVS5	
S1603FF.....	
CACNA1E	ILLWTFVQSEFKALPYVCLLIA	1615
CACNA1A	1705
CACNA1B	1607
CACNA1S	T.....IK..Q.....A...V	1275
CACNA1C	T.....IK..Q.....A...V	1416
CACNA1D	T.....IK..Q.....A....	1378
CACNA1F	T.....IK..Q.....A....	1335

Fig. 7d derecha inferior

Tabla Suplementaria S1: Detalles de los cebadores de PCR multiplex (externo) y PCR anidada (interno)

Gen	Cebador F: cebador delantero R: cebador reverso	Secuencia (5'-3')	No. de acceso de Genbank (NCBI)	Posición 5'-	Tamaño del amplicón [pb]
Calbindina d28k de ratón (CB)	F (externo)	CGCACTCTCAAACTAGCCG	M21531	87	891
	R (externo)	CAGCCTACTTCTTTATAGCGCA		977	
	F (interno)	GAGATCTGGCTTCATTCGAC		167	440
	R (interno)	AGTCCAGCTTCCGTCATTA		606	
Proteína ácida fibrilar glial de ratón (GFAP)	F (externo)	AGAACAAACCCTGGCTGCGTAT	K01347	407	786
	R (externo)	GCTCCTGCTTCGAGTCCTTA		1192	
	F (interno)	AGAAAGGTTGAATCGCTGGA		472	517
	(interno)	CCAGGGCTAGCTTAACGTTG		988	
Glutamato descarboxilasa de ratón (GAD65)	F (externo)	CATACGCAGACAGCAGCTTT	NM_008078.1	186	905
	R (externo)	AAAAGATTCCATCGCCAGAG		1070	
	F (interno)	GGGATGTCAACTACGCGTTT		606	389
	R (interno)	CACAAATACAGGGCGGATCT		994	

Fig. 8

Glutamato descarboxilasa de ratón (GAD67)	F (externo)	TGACATCGAGTCCCAATACC	Z49976	731	1105
	R (externo)	GGGTAGAGATGACCATCCG		1835	
	F (interno)	CATATGAAATTGCACCCGTC		761	702
	R (interno)	CGGTGTCATAGGAGACGTCA		1462	
Tirosina hidroxilasa de ratón (TH)	F (externo)	CACCTGGAGTACTTTGTGCG	M69200	387	1139
	R (externo)	CCTGTGGGTGGTACCCCTATG		1525	
	F (interno)	TGCACACAGTACATCCGTCA		936	377
	R (interno)	TCTGACACGAAGTACACCGG		1312	
Canal de calcio tipo R Cav2.3 de ratón (Ca _v 2.3)	F (bucle II-III externo)	CCATCTACTTTCATTGTGCTCACC	NM_009782.3	2043	816
	R (bucle II-III externo)	CCCCCTTCATCCAGACTCCG		2858	
	F (C terminal externo)	GACAGCAGCTGGAAGAACAGA		5670	641
	R (C terminal externo)	GATGGAGCTCTCAGTTAGGGAAC		6310	
	F (bucle II-III interno)	GGAGGTCAGCCCCGATGTC		2203	420
	R (bucle II-III interno)	GGGCTCCCTCTGGTTGTCC		2622	
	F (C terminal interno)	CTGAGTGGTCGGAGTGGATAC		5795	369
	F (C terminal interno)	AGAGAGGAGGTGCTTCGTTTC		6163	

Fig. 8 cont.

Tabla Suplementaria S2: Detalles de los ensayos de qPCR con TaqMan e información de la curva estándar.

Gen	ID de ensayo	Ensayo de TaqMan: cebador/sonda o secuencias consenso	No. de Genbank	pb	EB	datos de la curva estándar			
						T	Y	pendiente	R ²
mD2s (Ord2)	Hecho a la medida	P: ACCACTCAAGGATGCTGC	NM_010077.2	84	5-7	0.5	47.53 ± 0.60	-3.41 ± 0.10	0.99 ± 0.01
		F: CGAGCTTTCAGAGCCAACT							
		R: GCTTGACAGCATCTCCATTTC							
mD2i (Ord2)	Hecho a la medida	CA	NM_010077.2	73	6-7	0.5	46.14 ± 0.23	-2.53 ± 0.04	0.99 ± 0.00
		P: CATTCCTCCCTGTTTCAC							
		F: CTCTGCAACCGTTATCATGAAG							
mCav1.2 (Cactna1c)	Nm011886222_m1	TCTA	NM_001139533.1	65	26-27	0.6	39.95 ± 0.06	-2.35 ± 0.02	0.99 ± 0.00
		R: TCGCGGGGCGAGCAT							
		TGGAGGGTGGCCAGAGCTGC							

Fig. 9

mCav1.3 (Cacna1d)	Mm0055 1392_m1	TCCCTCCAGCTGGTGATGA TGAGGT	NM_001 083616	38- 39	0. 6	41.12 ± 0.08	\bar{x} 3.44 ± 0.02	0.99 ± 0.00	3
mCav2.3 (Cacna1e)	Mm0049 4444_m1	TTCTGGCCTGAGTGGTCG GAGTGGGA	NM_009 782	43- 44	0. 5	39.15 ± 0.13	\bar{x} 3.37 ± 0.01	1.00 ± 0.00	3
mNCS-1 (Ncs1)	Mm0049 0549_m1	CGAGAACAAAGGATGGCAG GATTGAG	NM_019 681.3	3-4	0. 3	39.26 ± 0.38	\bar{x} 3.35 ± 0.05	1.00 ± 0.00	3
hCav2.3 (CACNA1E)	Hs01060 941_m1	CTTCTTCIGCTCCTTCTTGA TGCTC	NM_001 205293. 1	37- 38	0. 5	43.21 ± 0.19	\bar{x} 3.25 ± 0.04	1.00 ± 0.00	7
hNCS-1 (NCS1)	Hs00977 274_m1	TACGGTGGGCCCTTCAAGCT CTACGA	NM_014 286.3	4-5	0. 5	40.36 ± 0.06	\bar{x} 3.34 ± 0.07	0.99 ± 0.00	6

Fig. 9 cont.

hND1 (ADN mito)	Hecho a la medida	P:CCATCACCCCTCTACATCA CCGCCC F:CCCTAAACCCGCCACAT CT R:GACCGATGGTGAGAGCT AGGT	NC_012 920.1	68	--	0. 5	33.59 \pm 0.1	3.30 \pm 0.04	1.00 \pm 0.00	2 1
hND4 (ADN mito)	Hecho a la medida	P:CCGACATCATTACCGCG TTTTCCCTCTTG F:CCATTCTCCTCCTATGCC TCAAC R:CACAATCTGATGTTTGG TTAAAGTATATT	NC_012 920.1	83	--	0. 5	35.02 \pm 0.09	3.47 \pm 0.04	1.00 \pm 0.00	2 1

Fig. 9 cont.

Tabla Suplementaria S3: Detalles de mesencéfalos humanos *post mortem* analizados

ID del cerebro	CERAD	BRAAK	sexo	años (edad)	PMI (h)	RIN
controles adultos						
LFD 40 ¹ #	0	0	m	37	11	7.7
LFD 41 ¹	0	0	f	46	27	8.5
LFD 43 ¹ ~#	0	0	m	34	10	8.3
LFD 44 ¹ ~#	0	0	m	40	9	7.7
LFD 45 ¹ ~#	0	0	m	46	19	8.4
LFD 46 ¹ ~#	0	0	m	49	14	8.6
media \pm SEM: 42.0 \pm 2.4 15.0 \pm 2.8 8.2 \pm 0.2						
controles envejecidos						
LFD 5 ²	A	I	f	69	14	6.5
LFD 6 ²	0	I	m	62	31	6.2
LFD 7 ²	0	II	m	72	6	6.6
LFD 10 ²	0	I	f	75	24	6
LFD 11 ²	0	0	m	63	24	5.9
LFD 15 ²	0	0	m	61	6.5	1.9
LFD 16 ²	0	I	f	69	24	6.8
LFD 17 ²	0	II	f	68	120	5.9
LFD 18 ²	0	I	f	71	72	6.5
LFD 19 ²	0	I	m	72	24	6.6

Fig. 10

LFD 21 [~]	0	I	I	73	24	9.2
LFD 22 [~]	0	I	m	67	16	6.4
LFD 26 [~]	0	II	I	83	22	6.8
LFD 27 [~]	A	I	m	76	24	6.9
LFD 28 [~]	0	0	I	76	11	6.4
LFD 37 [~]	0	II	I	81	18	4
media \pm SEM 71.1 \pm 1.57 28.8 \pm 7.13 6.2 \pm 0.38						
PD envejecidos						
LFD 1 [~]	0	II	I	79	17	7.3
LFD 2 [~]	0	0	m	79	23	7.5
LFD 3 [~]	B	III-IV	m	80	23	6.8
LFD 4 [~]	0	II	m	80	7	7.1
LFD 14 [~]	0	V	I	73	11	7.7
LFD 31 [~]	A	II	I	83	29	8.8
LFD 33 [~]	0	II	m	83	24	6
LFD 35 [~]	A	III	I	85	16	8.2
LFD 36 [~]	0	<III	m	79	9	6.6
media \pm SEM 80.1 \pm 1.15 17.7 \pm 2.53 7.3 \pm 0.28						

Abreviaciones: CERAD: Consorcio para establecer un registro para la enfermedad de Alzheimer; PMI: intervalo en horas post mortem; RIN: número de integridad del ARN; PD: Enfermedad de Parkinson; AD: Enfermedad de Alzheimer; + utilizado para la cuantificación del ARNm de ND1; ~ utilizado para la cuantificación del ARNm de NCS-1 y Cav2.3, #utilizado para la cuantificación del ADN genómico mitocondrial de ND1 y ND4.

Fig. 10 cont.

Tabla Suplementaria S4: actividad *in vitro* de las neuronas DA de la SN en el último minuto en dopamina.

	actividad de DA de la SN a los 15 min en dopamina [%]					
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n
Adulto WT*	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0-0.0	14
Juvenil WT*	40.0	31.8	7.5	44.7	0.0-66.4	18
Adulto WT EGTA*	22.8	30.8	11.6	0.0	0.0-72.9	7
Adulto WT DNIP	56.8	36.2	20.9	55.2	21.4-93.8	3
Adulto KO NCS-1	31.3	38.0	12.7	0.0	0.0-80.3	9
Adulto WT isradipina	1.5	4.6	1.5	0.0	0.0-0.0	9
Adulto WT Z941	2.8	6.6	2.2	0.0	0.0-5.3	9
Adulto WT ω-ctx MVIIC	15.0	24.9	10.2	3.1	0.0-63.1	6
Adulto WT SNX-482	33.7	28.8	11.8	34.9	0.0-73.2	6
Adulto KO Cav2.3	26.2	33.9	12.8	7.4	0.0-74.7	7

Fig. 11

Tabla Suplementaria S5: parámetros de marcapasos *in vitro* de las neuronas DA de la SN

A) frecuencia del marcapasos de DA de la SN [Hz]						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n
Adulto WT	2.6	1.0	0.2	2.8	1.9-3.5	19
Adulto WT Isradipina	3.2	0.9	0.3	2.8	2.7-3.9	9
Adulto KO Cav1.3	3.3	1.1	0.3	3.4	2.6-3.7	13
Adulto WT SNX-482	2.0	0.5	0.2	2.0	1.3-2.8	6
Adulto KO Cav2.3	2.3	0.7	0.3	2.5	1.0-3.1	8
B) precisión del marcapasos de DA de la SN, CV ISI [%]						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n
Adulto WT	8.1	5.4	1.5	6.4	4.7-13.2	14
Adulto WT Isradipina	9.9	3.4	1.2	10.1	5.8-14.6	8
Adulto KO Cav1.3	11.4	5.6	2.3	10.1	5.3-19.2	6
Adulto WT SNX-482	9.8	3.2	1.3	8.4	7.0-15.0	6
Adulto KO Cav2.3	15.1	6.0	2.1	16.6	7.4-24.4	8
						0.0038

Fig. 12

C) precisión del marcapasos de DA de la SN, CV 2 [%]							
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	valor-p (comparado con un adulto WT)
Adulto WT	3.5	1.9	0.5	2.9	2.2-5.5	13	
Adulto WT Isradipina	5.7	1.9	0.7	5.4	3.6-8.6	8	0.0126
Adulto KO Cav1.3	5.4	2.4	1.0	5.1	2.4-9.3	6	0.0715
Adult WT SNX-482	4.2	2.1	0.8	3.0	2.7-7.4	6	0.4155
Adulto KO Cav2.3	9.9	6.1	2.2	8.7	2.7-22.8	8	0.0013

Fig. 12 cont.

Tabla Suplementaria S6 A/B: obtención de imágenes de Ca^{2+} en las neuronas DA de la SN y VTA

	A) Actividad espontánea de los transientes dependientes de Ca^{2+}									
	máx. amplitud (proporción Fura-2 norm.)					área bajo la curva				
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana
DA de la SN WT	1.10	0.03	0.01	1.09	1.08-1.12	8	399.5	101.8	36.0	376.6
DA de la SN KO Cav2.3	1.06	0.02	0.01	1.05	1.04-1.08	9	233.9	62.8	20.9	210.9
DA del VTA WT	1.02	0.01	0.004	1.03	1.02-1.04	7	137.4	48.2	18.2	120.0
valores-p para máx. amplitud: SN DA WT vs. Cav2.3 KO: 0.0016; VTA DA WT vs. SN DA WT: <0.0001; VTA DA WT vs. SN DA Cav2.3 KO: 0.0094										
valores-p para el área bajo la curva: SN DA WT vs. Cav2.3 KO: 0.0004; VTA DA WT vs. SN DA WT: <0.0001; VTA DA WT vs. SN DA Cav2.3 KO: 0.0185										
	B) Potencial de acción de los transientes inducidos de Ca^{2+}									
	control WT					WT SNX-482				
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana
neuronas DA de la SN	1.08	0.03	0.01	1.08	1.05-1.12	6	1.07	0.03	0.01	1.07
Señal remanente de Ca^{2+} [%]							76.3	16.6	6.8	77
valores-p para control WT vs. WT SNX-482: 0.031; valores-p para la señal remanente de Ca^{2+} : 0.0173										

Fig. 13

Tabla Suplementaria S7 A/B/C: qPCR de células individuales para datos de neuronas DA de la SN de ratones y humanos

ARNm analizado	A) Ratón WT juvenil versus adulto											
	juvenil						adulto					
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n
mCav2.3	10.3	3.3	0.9	10.7	4.6-15.5	13	21.4	13.9	2.7	15.6	5.8- 53.9	27
mCav1.2	8.4	3.4	0.7	7.6	3.0-17.4	26	6.1	3.4	0.7	5.9	1.4- 13.9	25
mCav1.3	7.1	4.0	0.8	6.5	1.3-19.6	25	4.3	3.0	0.6	3.5	0.7- 13.7	25
mNCS-1	34.8	15.0	4.2	32.2	14.1- 63.0	13	30.2	16.7	4.5	23.7	5.7- 64.1	14
mNCS1/ mCav2.3	3.4	1.2	0.3	3.6	2.4-4.5	13	1.5	0.6	0.2	1.2	1.0- 2.2	14
mD2s	1.0	0.6	0.3	0.7	0.2-1.9	10	1.7	0.5	0.2	1.5	1.2- 2.2	10
mD2l	1.0	0.8	0.3	0.7	0.2-2.1	10	2.0	0.6	0.2	1.8	1.4- 2.5	10
mD2l/ mD2s	1.0	0.3	0.1	1.2	0.7-1.3	10	1.3	0.4	0.1	1.3	0.8- 1.7	10

Fig. 14

B) ARNm de Cav2.3 en WT versus ratón KO NCS-1													
	WT						KO NCS-1						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n	valor-p*
Juvenil (PN 13)	26.8	9.0	2.4	25.8	13.1- 37.6	14	13.6	7.2	1.6	13.3	4.1- 27.4	20	0.0002
Envejecido (PN 550)	25.1	9.6	2.5	23.8	7.8-41.6	15	14.7	4.4	1.2	15.9	8.2- 24.6	14	0.0007

C) neuronas DA de la SN humanas												
	Estándar de sangre						Control adulto					
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n/N	media	±SD	±SE	mediana	95% CI	n/N
									M			
hNCS-1/ hCav2.3							1.0	0.7	0.1	0.7	0.5-1.2	39/5
ARNm de ND1							1.0	0.5	0.1	0.9	0.6-1.4	23/4
ADNg de hND1							1.0	0.5	0.1	0.9	0.7-1.1	81/6
hND4/hND 1	1.0	0.3	0.1	0.9	0.9-1.2	21/1	0.8	0.1	0.0	0.9	0.8-0.9	83/6

Fig. 14 cont.

	C) neuronas DA de la SN humanas												
	Control adulto						PD						
	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n/N	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n/N	valor-p*
hNCS-1/ hCav2.3	1.0	0.7	0.2	0.9	0.5-1.4	19/4	1.1	0.6	0.2	0.9	0.5- 1.8	14/3	0.6949
ARNm de ND1	2.5	1.4	0.3	2.3	1.3-2.9	27/4	2.0	0.8	0.2	2.0	1.3- 2.7	19/4	<0.000 1
ADNg de hND1	1.0	0.7	0.1	0.8	0.6-0.9	148/1 0	0.9	0.4	0.1	0.9	0.7- 1.0	73/5	0.1764
hND4/hND 1	0.9	0.3	0.0	0.9	0.9-1.0	150/1 0	0.8	0.3	0.0	0.8	0.7- 0.9	75/5	0.0112

Fig. 14 cont.

Tabla Suplementaria S8 A/B/C: Datos de estereología y densitometría

A) neuronas DA de la SN												
	WT					KO NCS-1						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	valor-p:
juvenil	5707	459	265	5647	5282-6193	3	3991	226	130	4001	3760-4211	0.0013*
adulto	5498	76	44	5535	5411-5548	3	4094	118	68	4111	3968-4202	0.0063~
1 año	5219	276	123	5179	4989-5689	5	4124	280	114	4170	3653-4475	0.0165~
1.5 años	4949	152	88	4990	4781-5077	3	3809	228	132	3682	3673-4073	0.0270~
												0.0493~
neuronas DA del VTA												
	WT					KO NCS-1						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	valor-p:
juvenil	5683	79	46	5703	5596-5751	3	5464	173	100	5373	5355-5664	0.6752*
adulto	5570	226	131	5667	5311-5731	3	5458	95	55	5501	5349-5523	0.1985~
												0.3284~

Fig. 15

1 año	5609	201	90	5637	5279-5822	5	5673	233	116	5703	5371-5916	4	0.5668
1.5 años	5571	336	194	5585	5228-5920	3	5541	197	114	5604	5320-5698	3	0.9590

~valor-p de pruebas Dunn no corregidas dado que cada comparación es independiente.

B) Estriado dorsal (DS)													
control							MPTP						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	valor-p*
NCS-1 WT	32.8	5.1	1.4	32.1	28.1-36.4	14	13.8	6.9	1.9	15.2	5.8-20.6	13	<0.0001
KO NCS-1	31.9	6.1	1.9	29.9	25.9-39.4	10	7.4	4.6	1.4	6.0	3.5-15.3	11	<0.0001
Cav2.3 WT	32.9	2.7	0.9	32.8	30.2-36.0	9	14.7	7.0	1.9	16.8	8.1-21.3	13	<0.0001
KO Cav2.3	36.1	5.6	1.9	33.7	31.2-42.3	9	23.4	7.2	2.1	22.8	19.8-30.0	12	0.0005

Fig. 16 cont.

	Estriado ventral (VS)												
	control						MPTP						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	valor-p*
NCS-1 WT	32.7	6.4	1.7	31.7	25.8-39.4	14	26.8	5.1	1.4	28.0	22.4-33.0	13	0.0193
KO													
NCS-1	36.2	9.1	2.9	33.8	27.9-45.4	10	27.7	6.7	2.0	27.2	20.6-36.2	11	0.0357
Cav2.3 WT	33.4	4.9	1.6	32.5	28.0-39.5	9	24.9	3.7	1.0	25.0	21.5-28.1	13	0.0004
KO													
Cav2.3	40.5	8.1	2.7	37.1	33.2-51.6	9	31.2	5.6	1.6	29.1	26.4-37.3	12	0.0227
	Sustancia negra (SN)												
	control						MPTP						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	valor-p*
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	valor-p*
NCS-1 WT	4351	780	208	4224	3171-5887	14	2070	688	191	1839	1159-3576	13	<0.0001
KO													
NCS-1	3519	289	91	3454	3239-4090	10	1257	364	110	1332	657-1644	11	<0.0001
Cav2.3 WT	3959	643	215	3826	3637-4622	9	2535	890	247	2906	1566-3542	13	0.0002
KO													
Cav2.3	4170	520	174	4264	3475-4833	9	3990	454	144	3938	3618-4286	10	0.4002

Fig. 15 cont.

	Area tegmental ventral (VTA)												
	control						MPTP						
	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SEM	mediana	95% CI	n	valor-p*
NCS-1 WT	6499	1222	327	6414	4387-9188	14	5045	1250	347	4763	2948-5808	13	0.0091
KO NCS-1	6217	911	288	6057	5156-8364	10	4076	1009	304	4333	1755-4871	11	<0.0001
Cav2.3 WT	6806	825	275	6731	5934-7910	9	6057	1209	335	5600	5238-7683	13	0.0708
KO Cav2.3	7480	931	310	7547	6679-8285	9	5689	660	209	6642	6071-7167	10	0.0535

Fig. 15 cont.

C) Fibras restantes [%]													
	WT MPTP					KO MPTP							
	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n	valor-p*
KO NCS-1 DS	42.2	21.3	5.9	46.4	17.6- 63.1	13	23.7	15.5	4.7	18.0	10.4- 50.1	11	0.0253
KO NCS-1 VS	81.2	11.3	3.1	77.7	71.3- 93.7	13	76.8	19.7	6.0	76.6	55.7- 102.2	11	0.4987
KO Cav2.3 DS	44.7	21.4	5.9	50.8	24.5- 64.2	13	66.0	19.4	5.6	65.4	57.0- 83.9	12	0.0159
KO Cav2.3 VS	74.5	12.3	3.4	76.7	62.7- 86.1	13	78.2	13.5	3.9	75.8	67.3- 90.4	12	0.4817
Neuronas restantes [%]													
	WT MPTP					KO MPTP							
	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n	valor-p*
KO NCS-1 SN	47.6	15.8	4.4	42.2	26.6- 82.2	13	35.7	10.0	3.0	36.6	19.3- 48.3	11	0.0431
KO NCS-1 VTA	77.8	19.9	5.5	72.2	46.3- 106.9	13	65.6	16.2	4.9	70.0	28.3- 78.7	11	0.1169
KO Cav2.3 SN	64.1	23.0	6.4	74.6	40.2- 86.7	13	95.4	11.0	3.5	93.8	86.2- 109.3	10	0.0007
KO Cav2.3 VTA	95.8	19.1	5.3	88.6	62.8- 121.5	13	96.7	9.5	3.0	96.1	87.8- 103.7	10	0.8880

Fig. 15 cont.

C) Fibras restantes [%] (aproximación de bootstrap)												
	WT MPTP						KO MPTP					
	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n
KO NCS-1 DS	43.0	21.7	1.6	43.3	33.7- 51.8	182	24.0	15.1	1.4	19.6	17.8- 21.3	110
KO NCS-1 VS	84.9	22.7	1.7	80.8	76.8- 87.7	182	80.5	26.2	2.5	76.1	70.5- 83.4	110
KO Cav2.3 DS	45.0	21.0	1.9	48.0	45.6- 51.9	117	66.2	21.8	2.1	66.4	61.6- 70.3	108
KO Cav2.3 VS	76.0	15.2	1.4	73.4	70.7- 77.9	117	79.5	19.4	1.9	77.6	74.8- 80.4	108
Neuronas restantes [%] (aproximación de bootstrap)												
	WT MPTP						KO MPTP					
	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n	media	±SD	±SE M	mediana	95% CI	n
KO NCS-1 SN	49.0	17.9	1.3	45.0	19.7- 112.8	182	35.9	10.2	1.0	37.5	16.1- 50.7	110
KO NCS-1 VTA	80.1	24.1	1.8	76.5	32.1- 155.2	182	66.7	18.0	1.7	70.8	21.0- 94.5	110
KO Cav2.3 SN	65.8	25.6	2.4	67.8	57.7- 75.9	117	97.1	16.0	1.7	95.3	90.3- 99.7	90
KO Cav2.3 VTA	90.1	20.2	1.9	88.3	83.2- 92.3	117	90.7	13.7	1.4	89.1	86.5- 93.2	90

Fig. 15 cont.

Tabla Suplementaria S9: Mutaciones de novo en el sitio de empalme y sin sentido en CACNA1E identificadas en pacientes con trastornos del neurodesarrollo (NDD) y discapacidad intelectual (ID)

Fenotipo	Posición (hg19)	Var- ante	Clase de mutación	ADNc ^a	Proteína	Exón / Intrón	CADD Indel	Pólimo -2 (perc)	REVEL score	Ref
NDD	chr1:181 687488	A>G	aceptor de empalme	c.1526- 24>G	NA	intrón 11	NA	NA	NA	1
NDD	chr1:181 735748	G>T	donador de empalme	c.4651+1 G>T	NA	intrón 35	NA	NA	NA	1
NDD	chr1:181 548867	G>A	sin sentido	c.578 G>A	p.(R193H)	exón 4	34.0	1.000	0.935	1
NDD	chr1:181 549608	T>A	sin sentido	c.843 T>A	p.(I283N)	exón 6	24.0	0.970	0.747	1
ID	chr1:181 620576	G>A	sin sentido	c.1054 G>A	p.(G352R)	exón 7	25.8	1.000	0.913	2
autismo	chr1:181 706296	G>A	sin sentido	c.3825 G>A	p.(S1239 S)	exón 25	33.0	0.999	0.977	3

Fig. 16

NDD	chr1:181 726197	A>T	sin sentido	c.4264 A>T	p.(I1422F)	exón 30	26.0	0.999	0.918	1
ID	chr1:181 732660	C>T	sin sentido	c.4808 C>T	p.(S1603F)	exón 34	33.0	1.000	0.961	2

*basado en el número de transcrito de RefSeq NM_001205293.1

Fig. 16 cont.

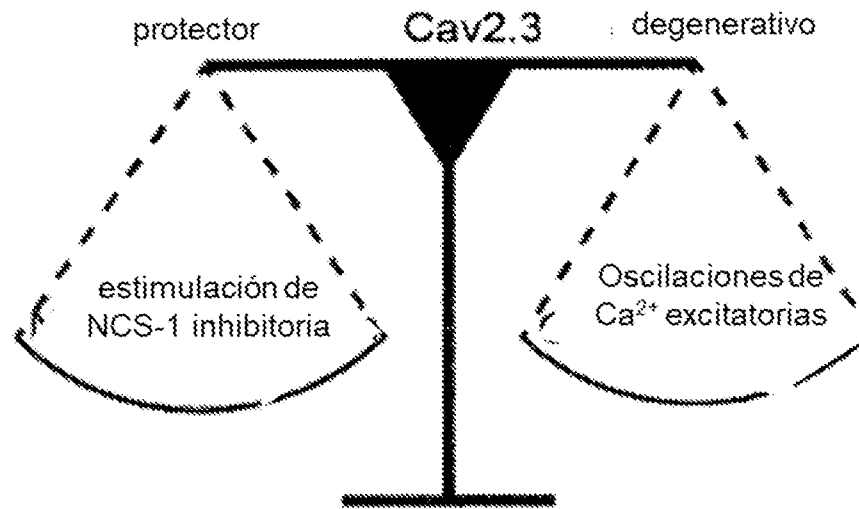


Fig. 17 izquierda

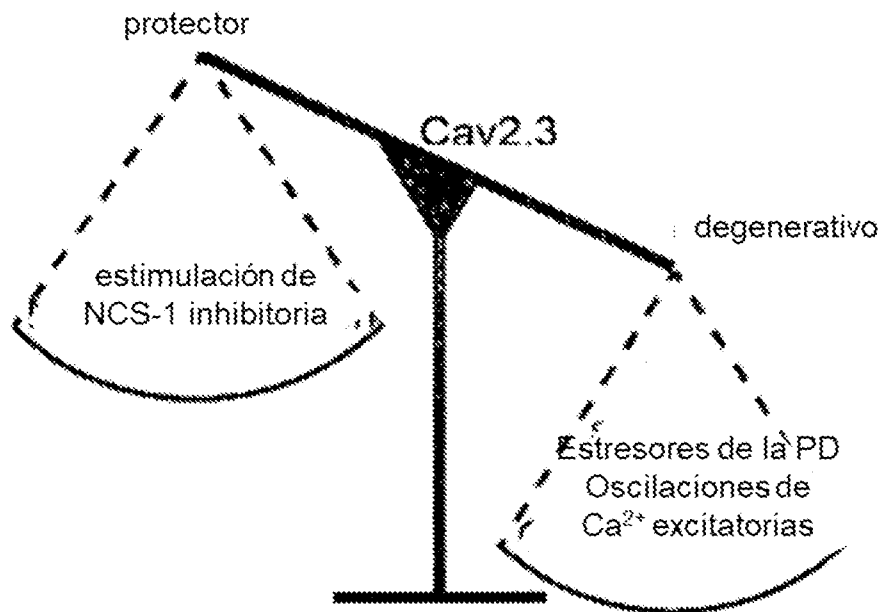


Fig. 17 derecha