

Préambule	4
I. La Maladie de Parkinson	8
1. Symptomatologie	8
A. Symptômes moteurs	8
a. Les tremblements au repos	8
b. La bradykinésie	8
c. L'akinésie	8
d. La rigidité	9
B. Les symptômes non moteurs	9
a. Les symptômes neuropsychiques	9
b. Les troubles du sommeil	9
c. Les troubles du système nerveux autonome	9
2. Histopathologie	9
A. Neurodégénérescence	10
B. Les corps et les neurites de Lewy	10
3. Physiopathologie	13
A. Dysfonction mitochondriale et stress oxydatif	13
B. Défaillance du système ubiquitine protéasome	14
4. Origine de la maladie de Parkinson	16
A. Les formes sporadiques	16
B. Les formes génétiques	17
a. La protéine DJ-1	19
DJ-1 dans la maladie de Parkinson.	20
b. La Parkine	21
Fonction ubiquitine-ligase de la parkine.	22
Fonction d'ubiquitine ligase et rôle dans la maladie de Parkinson.	24
Fonction de facteur de transcription : Nouvelle avancé et rôle dans la maladie de Parkinson.	24
5. p53 et apoptose	25
A. L'apoptose	25
a. L'apoptose de Type I	25
La voie intrinsèque :	25
La voie extrinsèque :	26
La voie réticulaire :	26
b. L'apoptose de type II	26
B. p53.	26
C. P53 et l'apoptose dans la maladie de Parkinson	27
II. La Maladie d'Alzheimer	30
1. Epidémiologie	30
2. Histopathologie.	30
3. Symptômes	31
4. Origines de la maladie	31
A. Les formes sporadiques à début tardif	31
B. Les formes familiales à début précoces	32
5. Les Causes de la maladie d'Alzheimer : hypothèse de la cascade amyloïde et clivage de la β APP	32
A. La β APP	32
B. Les clivages de la β APP	33
a. Le clivage β -sécrétase	33
b. Le clivage γ -sécrétase.	34
c. Les présénilines.	34
d. Le peptide A β .	35
6. L'apoptose dans la maladie d'Alzheimer : un lien avec p53.	37

III. Les gliomes	39
1. Définition et généralités	39
2. Epidémiologie	39
3. Causes	39
4. Aspects cliniques	40
5. Classification	40
A. Classification de l'hôpital Sainte Anne	41
B. La classification de l'OMS	41
a. Les astrocytomes.	41
b. Les oligodendrogliomes.	42
c. Les oligoastrocytomes.	42
6. Voies de signalisations dérégulées dans les gliomes.	42
A. p53	43
B. La voie pRB.	44
C. La voie PI3K–PTEN–Akt–mTOR	44
7. La parkine	45
A. Rôle de la parkine dans les tumeurs périphérique	45
B. Rôle de la parkine dans les tumeurs du système nerveux central : Le cas des gliomes	46
IV. Lien entre les pathologies	48
1. Lien entre maladie de Parkinson et maladie d'Alzheimer	48
2. Liens entre maladie de Parkinson et les gliomes.	48
V. Objectifs	50
VI. Résultats	51
Article 1	52
La parkine endogène est surexprimée et contrôle la transcription des présénilines.	53
Effet de la parkine sur les fonctions associées au présénilines.	53
Le contrôle de la parkine sur l'expression des PS est indépendant de son activité d'ubiquitine ligase.	53
La régulation des PS est indépendante de p53 et ne fait pas intervenir le contrôle réciproque des PS l'une sur l'autre.	54
PS1 et PS2 sont des cibles transcriptionnelles de la parkine.	54
Identification de la séquence consensus de fixation de la parkine.	54
Conclusion.	55
Contribution personnelle à ce projet.	55
Article 2	56
La parkine contrôle DJ-1 dans les cellules et les cerveaux de souris.	57
Les mutants de la parkine abolissent son effet sur DJ-1.	57
DJ-1 est contrôlé par p53.	57
Le contrôle de DJ-1 par la parkine dépend de p53.	58
DJ-1 est contrôlée par le stress du réticulum via le facteur de transcription XBP-1.	58
XBP-1 est contrôlé par la parkine et p53.	58
Conclusion.	59
Contribution personnelle à ce projet.	59
Article 3	60
Il existe une corrélation inverse entre l'expression de la parkine et l'expression de p53 dans les gliomes.	61
L'expression de la parkine est diminuée dans plusieurs types de tumeurs en fonction de la présence de mutations de p53.	61
Des mutations de p53 fréquemment associées aux cancers entraînent une diminution d'expression de la parkine et la transactivation de son promoteur.	62
Les délétions de p53 conduisent à une réduction de l'expression de la parkine dans des lignées cellulaires et des cerveaux de souris.	62

	p53 contrôle la transcription de la parkine via ses propriétés de fixation sur l'ADN. _____	62
	Conclusion. _____	63
VII.	<i>Discussion</i> _____	64
	Régulation des présénilines 1 et 2 par la parkine. _____	64
	Régulation de DJ-1 par la parkine. _____	65
	Rétrocontrôle de p53 sur la parkine et dialogue fonctionnel dans les gliomes. _____	67
	Conclusions et perspectives. _____	68
VIII.	<i>Références bibliographiques.</i> _____	70

I. La Maladie de Parkinson

L'ensemble de symptômes constituant cette pathologie ont été décrits pour la première fois en 1817 par James Parkinson dans son essai « Essay on a shaking palsy », mais son nom définitif ne lui sera donné qu'en 1962 par Jean Martin Charcot.

La maladie de Parkinson est un syndrome moteur progressif particulièrement invalidant. Elle constitue, de par son incidence, la seconde atteinte neurodégénérative.

1. Symptomatologie

La maladie de Parkinson présente un tableau symptomatologique caractéristique. Ces symptômes sont de deux types, selon qu'ils touchent les fonctions motrices ou pas. En parallèle, il existe plusieurs échelles mesurant la progression de la maladie.

L'échelle de Hoehn et Yard [1] qui mesure la progression des symptômes moteurs en cinq stades.

L'échelle UPDRS (pour Unified Parkinson's Disease Rating Scale) plus précise que la précédente et qui prend en compte l'impact de la maladie sur l'ensemble des paramètres de la vie du patient.

A. Symptômes moteurs

a. Les tremblements au repos

Les tremblements au repos sont le symptôme le plus caractéristique de la maladie de Parkinson. Ils touchent près de 70% des patients, se manifestant d'abord aux niveaux des extrémités (mains, pieds), généralement d'un seul côté du corps (unilatéral), pour ensuite remonter progressivement et gagner tout le corps, à l'exception de la face et du cou. Leurs caractéristiques sont de disparaître lors du mouvement et du sommeil et d'être amplifiés par des efforts de concentration.

b. La bradykinésie

Elle se définit par une lenteur des mouvements des membres mais aussi de la face et du cou. Elle est responsable de la démarche caractéristique des patients Parkinsoniens, de petits pas trainants et lents. Cette lenteur est également handicapante dans l'exécution de mouvements fins (comme l'écriture), rendant avec le temps leurs réalisations impossibles.

c. L'akinésie

L'akinésie se définit comme une difficulté à initier les mouvements. Le patient est alors dans l'incapacité de réaliser certains mouvements automatiques, il a alors besoin de se concentrer pour les réaliser. Contrairement au tremblement au repos l'akinésie touche aussi la face et il en résulte la perte de nombreuses expressions faciales (le patient a un visage impassible, la bouche entrouverte, le regard fixe).

d. La rigidité

Son nom scientifique est l'hypertonie. Il s'agit d'une tension excessive des muscles provoquant des douleurs musculaires et tendineuses. Elle participe à la difficulté du mouvement mais ne doit pas être confondue avec l'akinésie. Elle entrave le déroulement naturel des mouvements et leurs retirent toute aisance (on parle de mouvements en roue dentée) mais s'observent aussi au repos dans la posture crispée et voutée. Elle peut toucher l'ensemble des muscles du corps mais se concentre généralement le long de la colonne vertébrale et aux articulations.

B. Les symptômes non moteurs

a. Les symptômes neuropsychiques

Ces symptômes apparaissent lorsque les systèmes dopaminergiques, sérotoninergiques et noradrénergiques sont atteints. Il en résulte des troubles variables comme l'apathie, la dépression, l'agressivité ou l'anxiété accompagnée de crise de panique [2]. Le patient peut également développer des hallucinations visuelles, un état confus et une psychose [3].

b. Les troubles du sommeil

Dans la maladie de Parkinson ils se caractérisent de deux façons. Une difficulté à s'endormir et une difficulté à maintenir le sommeil. Les difficultés pour s'endormir sont directement liées à la maladie de Parkinson alors que les problèmes pour maintenir le sommeil serait d'ordre secondaire, notamment dû à une akinésie nocturne ou au trouble du système nerveux autonome (problèmes intestinaux et problèmes urinaires) [3].

c. Les troubles du système nerveux autonome

La maladie de Parkinson provoque des dérèglements des systèmes cholinergiques sympathiques et parasympathiques, ainsi que du système noradrénergique sympathique. Il en résulte une dysfonction du système nerveux autonome pouvant se traduire par :

- Des troubles gastro-intestinaux, urogénitaux et papillaires pour le système cholinergique parasympathique. Des problèmes de thermorégulation et de transpiration pour le système cholinergique sympathique. Des dysfonctions cardiaques et une hypotension pour le système noradrénergique.

Ces effets sont parfois très précoces et peuvent même apparaître lors de la phase pré-motrice.

2. Histopathologie

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui se caractérise au niveau histologique par une mort des neurones dopaminergiques du *locus niger* et par une apparition d'inclusion cytoplasmique, les corps de Lewy. Ces deux types de lésions permettent de confirmer le diagnostic symptomatique.

A. Neurodégénérescence

La première observation neuroanatomique d'une neurodégénérescence chez des patients atteints de syndromes Parkinsoniens a été réalisée par Konstantin Tretiakoff en 1919 [4]. Il y décrit une dépigmentation du *locus niger*. Cette dépigmentation est la conséquence de la mort des neurones dopaminergiques de cette zone qui produit naturellement de la mélanine responsable de cette coloration. C'est cette mort neuronale qui conduit à la baisse drastique des taux de dopamine dans les voies de projection nigro-striatale conduisant à l'apparition des symptômes. Il est d'ailleurs intéressant de noter que lors de l'apparition des premiers symptômes la baisse du taux de dopamine est d'au moins 35% [5] et la perte neuronale comprise entre 60% et 80%.

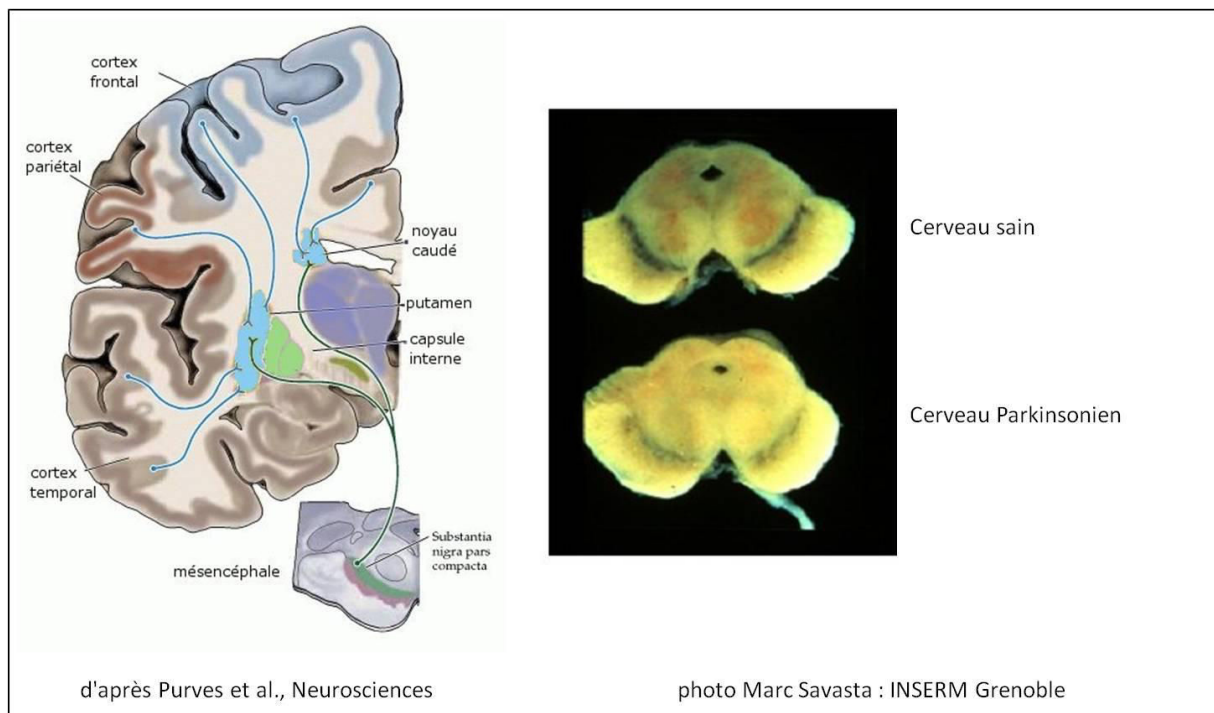


Figure 1: La substance noire en condition normale et pathologique et la voie nigro-striée

D'autres zones cérébrales et voies nerveuses peuvent être atteintes de manière moins systématiques, conduisant pour celles non directement liées au mouvement d'apparition de symptômes non-moteurs. Citons les neurones noradrénergiques du *locus coeruleus* [2, 6], les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé et les neurones cholinergiques des noyaux de la base de Meynert [7]. Dans les phases les plus tardives, le cortex cérébral (frontal et pariétal, le bulbe olfactif et l'hippocampe peuvent être atteints, bien que ce soit plus rare.

B. Les corps et les neurites de Lewy

On nomme corps de Lewy les inclusions de formes globulaires et neurites celles en forme de fuseau. Les corps de Lewy ont été décrit pour la première fois en 1912 par Friedrich Heinrich Lewy (Lewy, 1912) [8].

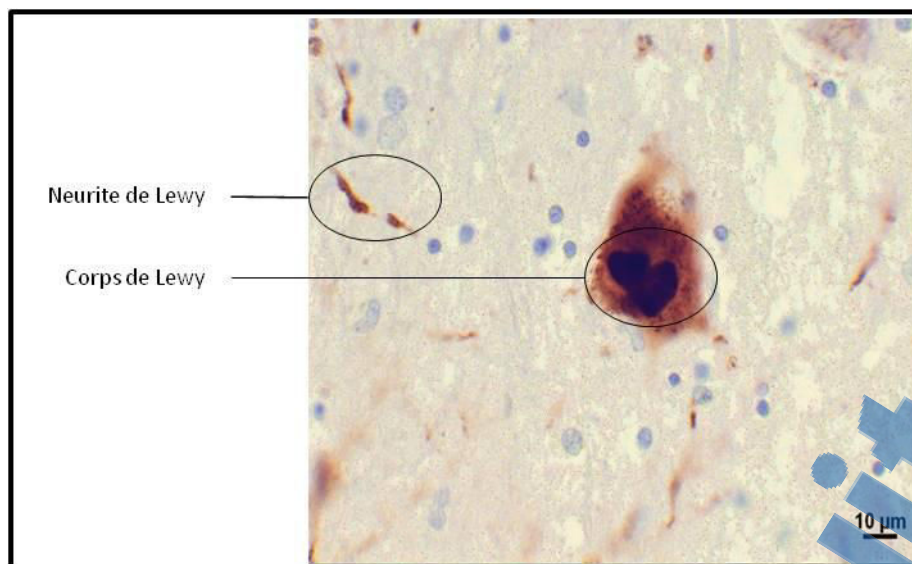


Figure 2: Les corps Lewy et les neurites de Lewy

Ce sont des inclusions intracytoplasmiques mesurant de 8 μm à 30 μm , composées de protéines agrégées. La protéine majoritaire est l' α -synucléine [9], mais on retrouve près de 70 protéines différentes dont celles impliquées dans les formes familiales de Parkinson : PINK-1 [10], UCHL-1 [11], Parkine [12], DJ-1 [13] et LRRK2 [14].

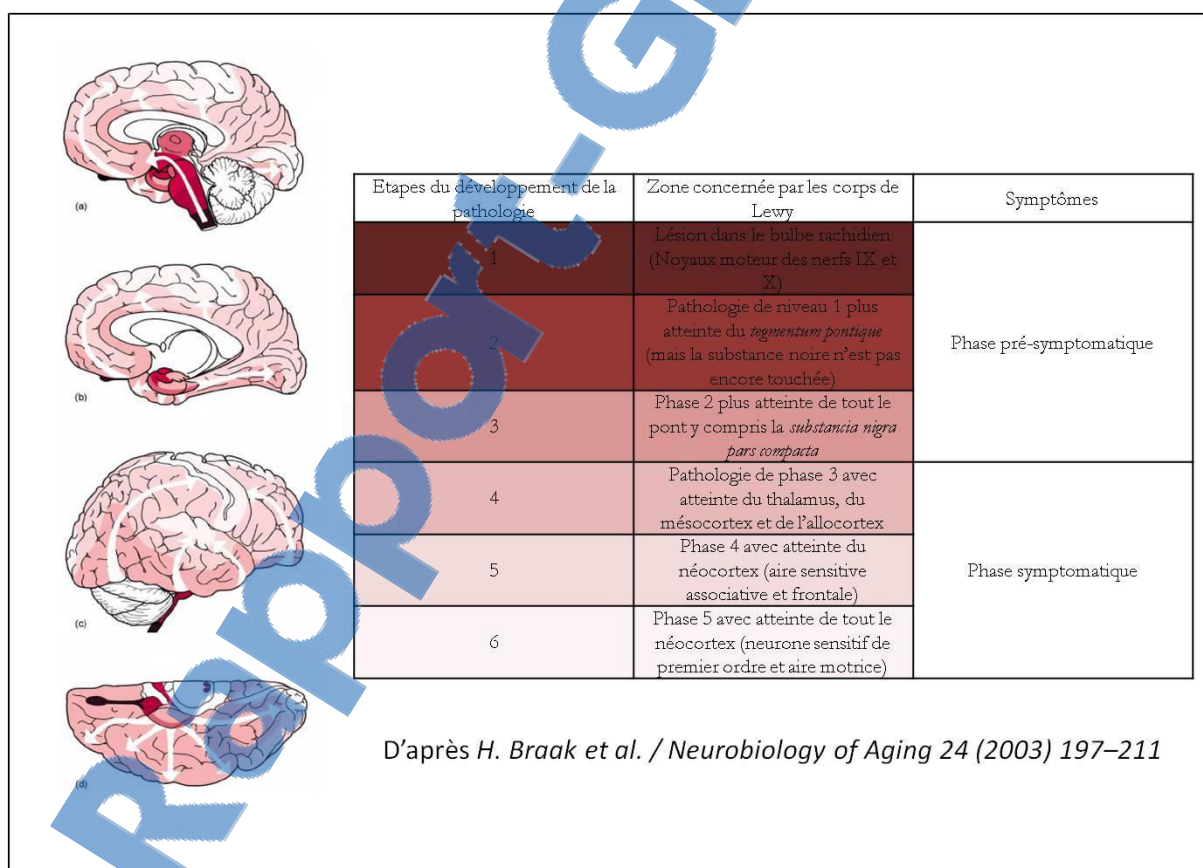


Figure 3: Progression des corps et neurites de Lewy dans la maladie de Parkinson

Bien que présents dans d'autres pathologies comme l'atrophie multi-systématisée ou la démence des corps de Lewy, ils permettent l'établissement d'une carte des zones affectées par la maladie de Parkinson. Ils sont présents dans le tronc cérébral et notamment dans la substance noire mais aussi dans le thalamus, le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cortex. La progression des corps de Lewy a été classée en plusieurs stades caractéristiques de l'évolution de la maladie [15, 16].

Dans le cas de maladies de Parkinson liées aux mutations de la parkine il a tout d'abord été montré une absence de corps de Lewy même à des stades très avancés de la maladie où les lésions du locus niger sont déjà présentes [17, 18]. La tentation a alors été grande de subdiviser les syndromes Parkinsoniens en deux catégories : les formes liées au corps de Lewy et des formes génétiques récessives sans synucléopathie. Cependant des études récentes semblent contredire ou du moins tempérer ce point, puisque il a été montré que les corps de Lewy sont détectables dans les formes de Parkinson liées à la mutation p.R275W [19-21].

Bien que caractéristique de la pathologie, le rôle précis des corps de Lewy dans le processus de mort cellulaire est encore très débattu. En effet, plusieurs éléments soutiennent un rôle neurotoxique. Tout d'abord et comme montré précédemment, les corps de Lewy sont présents dans les zones où la neurodégénérescence survient, ces zones étant celles impliquées dans les fonctions motrices et cognitives altérées dans Parkinson. De plus, le nombre d'inclusion est globalement stable dans le temps (des phases les plus précoces jusqu'aux phases les plus tardives). S'ils étaient neuro-protecteurs leurs nombres augmenteraient avec le temps. Ceci suggère l'existence d'un mécanisme de dégradation ou alors d'une disparition lors de la mort du neurone porteur. [22].

A contrario, il semble que la toxicité liée à l'accumulation de certaines protéines comme l' α -synucléine (composant majoritaire des corps de Lewy) semble baisser lors de l'agrégation de celles-ci. Ceci suggère que les Corps de Lewy pourraient servir de lieu de stockage pour des formes toxiques de certaines protéines.

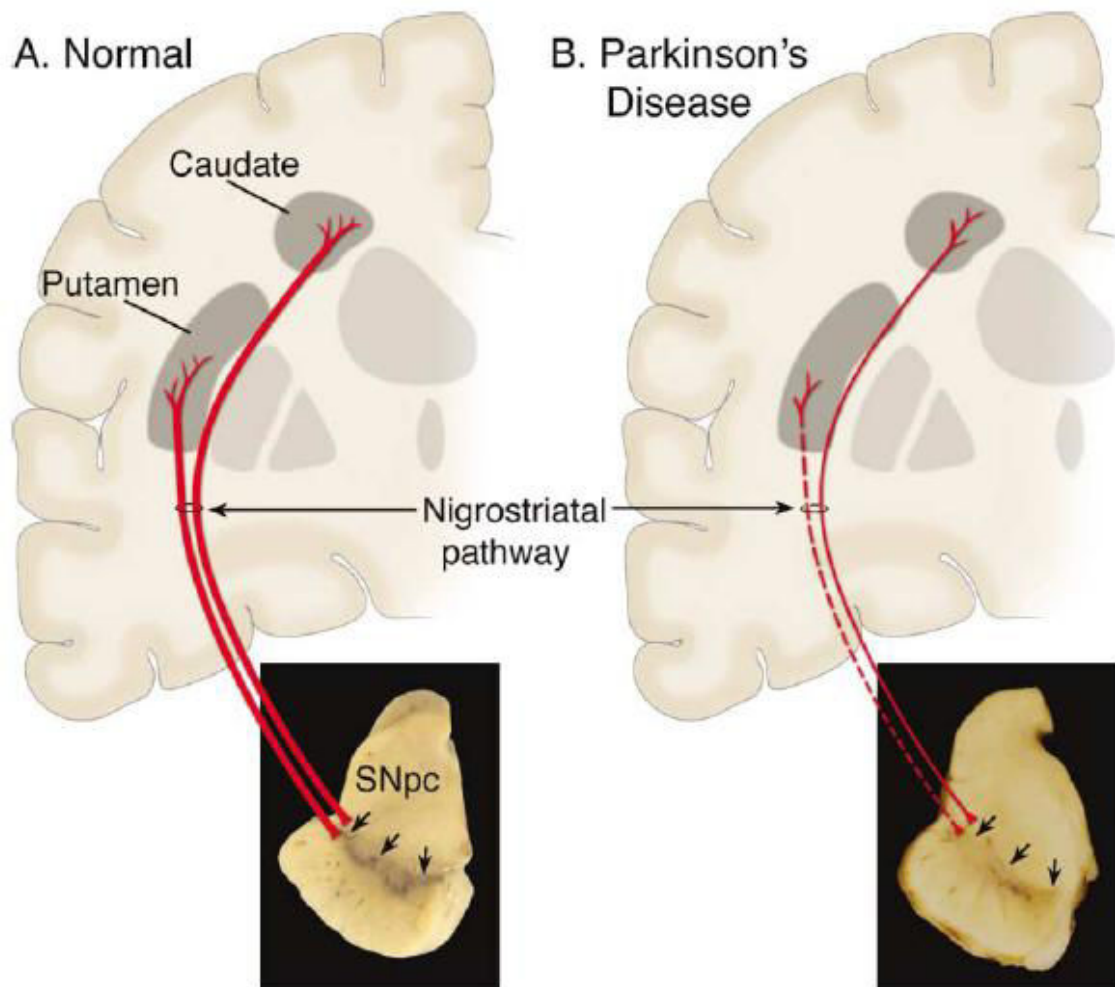


Figure 4: Voie Nigro-striatale en condition normale et pathologique

3. Physiopathologie

La mort des neurones observés dans la maladie de Parkinson est principalement due à deux phénomènes dont les mécanismes ne sont pas encore clairement compris. Il s'agit d'une dysfonction mitochondriale couplée à un stress oxydatif et d'une accumulation de protéines mal repliées. C'est deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et semblent tous les deux impliqués dans l'étiologie de la pathologie.

A. Dysfonction mitochondriale et stress oxydatif

La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée d'un ensemble de complexes protéiques situés au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Ils sont responsables de la création d'un gradient de protons et de la réoxydation des coenzymes NADH et ubiquinone (CoQ) qui ont été réduits au cours du cycle de Krebs.

Des études ont mis en évidence une dysfonction du complexe I dans la maladie de Parkinson [23, 24]. Il est donc légitime de se demander pourquoi les neurones dopaminergiques sont plus sensibles aux défaillances mitochondriales [25, 26]. Il semble en effet que des délétions

de l'ADN mitochondrial associées à des défauts de la chaîne respiratoire soient fréquemment retrouvés dans les neurones dopaminergiques [27, 28]. De plus des mutations spécifiques de cet ADN augmente le risque de maladie de Parkinson [29]. Les causes expliquant ce tropisme sont encore méconnues mais il semble que le stress oxydatif induit par les espèces réactives de l'oxygène joue un rôle prépondérant. Les espèces réactives de l'oxygène sont naturellement produites au niveau de la mitochondrie [30]. La réduction de l'activité du complexe 1 va conduire à une accumulation d'électrons qui vont réagir avec l'oxygène formant des ions superoxyde O_2^- . Il en résulte des dommages au niveau du génome et du transcriptome [31], ainsi qu'une oxydation des protéines et des lipides [32], ce qui est en soit suffisant pour entraîner une mort neuronale. De plus, la cellule s'engage sur la voie d'apoptose mitochondriale dépendante de Bax via l'augmentation du pool de cytochrome C soluble qui est présent dans l'espace intermembranaire des mitochondries [33]. Les neurones dopaminergiques sont particulièrement sensibles à ce stress oxydatif parce qu'ils possèdent la voie de synthèse de la dopamine qui est elle même génératrice de stress oxydatif [34].

B. Défaillance du système ubiquitine protéasome

L'accumulation de protéines peut se révéler délétère pour la cellule et conduire à de graves dysfonctionnements. Elle provient principalement de la production de protéines anormales, ou mutées. La cellule dispose de deux voies majeures de dégradation protéique. La première est la voie lysosomiale qui ne sera pas traitée ici. La seconde est le système ubiquitine-protéasome.

Cette voie de dégradation se caractérise par la fixation de motifs ubiquitines sur des protéines. Les protéines ainsi marquées sont ensuite prises pour cible par le protéasome, un complexe macromoléculaire de dégradation protéique.

L'ubiquitine est une protéine de 76 acides aminés et d'environ 8500 kDa, que l'on retrouve dans tous les compartiments subcellulaires. Elle se fixe via un résidu glycine spécifique de sa structure en position 76 (en C-terminal). Sur la protéine cible la fixation a lieu sur un résidu précis, souvent une lysine en position 68.

La fixation de l'ubiquitine implique une séquence de réactions enzymatiques bien précises faisant intervenir 3 enzymes [35] (figure 5). L'ubiquitine est d'abord fixée par l'enzyme E1. Cette première étape consiste en l'activation de l'ubiquitine. Par hydrolyse d'une molécule d'ATP, l'ubiquitine est fixée sur l'enzyme E1 via une liaison thioester de haute énergie. Par une réaction de transestérification, le motif ubiquitine est transféré de l'enzyme E1 vers une enzyme E2 de conjugaison. Le transfert vers la protéine cible fait alors intervenir une troisième enzyme E3 responsable de la reconnaissance de la cible et de la spécificité du transfert. L'enzyme E3 va reconnaître la séquence de dégradation, et lier la protéine cible, et également interagir avec l'enzyme E2. Par une réaction de transestérification le motif ubiquitine est alors transféré vers la protéine cible au niveau d'un résidu lysine [36, 37].

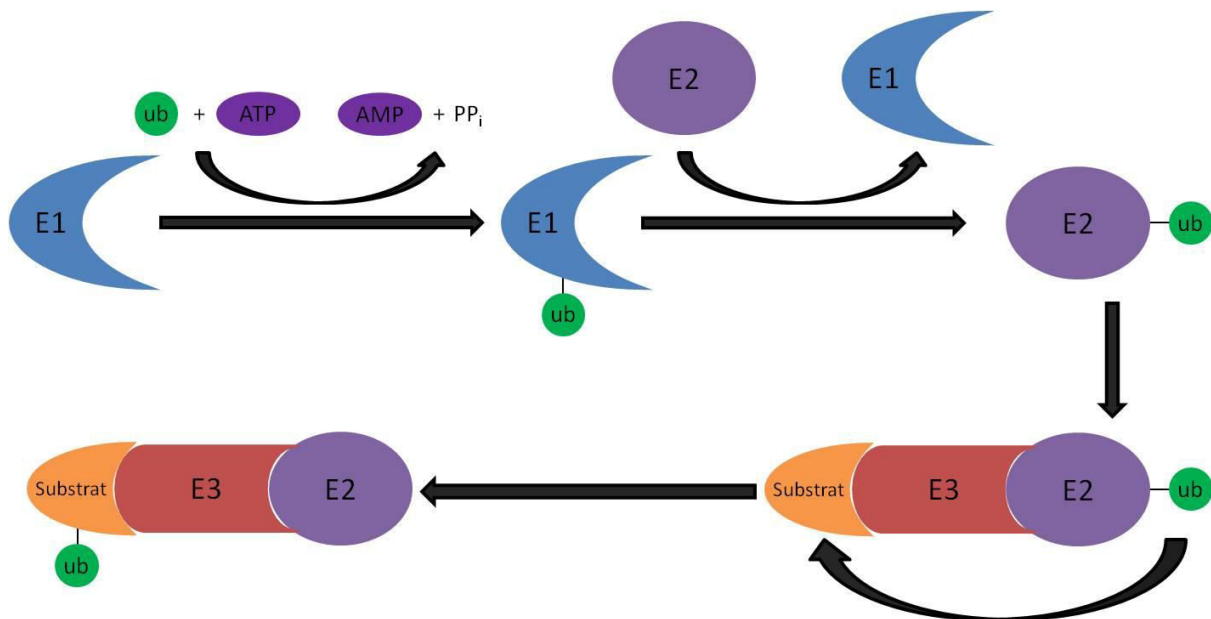


Figure 5: Séquence enzymatique conduisant à la fixation de l'ubiquitine sur une protéine cible.

Les protéines ainsi marquées sont alors dégradées par le protéasome. Il s'agit d'un complexe protéique composé d'une sous-unité 20S et de deux sous-unités 19S. L'assemblage d'une sous-unité 20S avec deux sous-unités 19S formant un complexe actif, le protéasome 26S.

Le protéasome 20S est constitué de sous-unités α et β organisées en 4 cylindres heptamériques (voir figure 6). Le rôle des sous-unités 19S est d'initier la dégradation. Les protéines sont reconnues grâce aux motifs ubiquitines qu'elles présentent, puis prises en charge, débabinées et transloquées vers le cœur catalytique 20S. Cette sous-unité possède des activités peptidases de type trypsine, chymotrypsine et caspase.

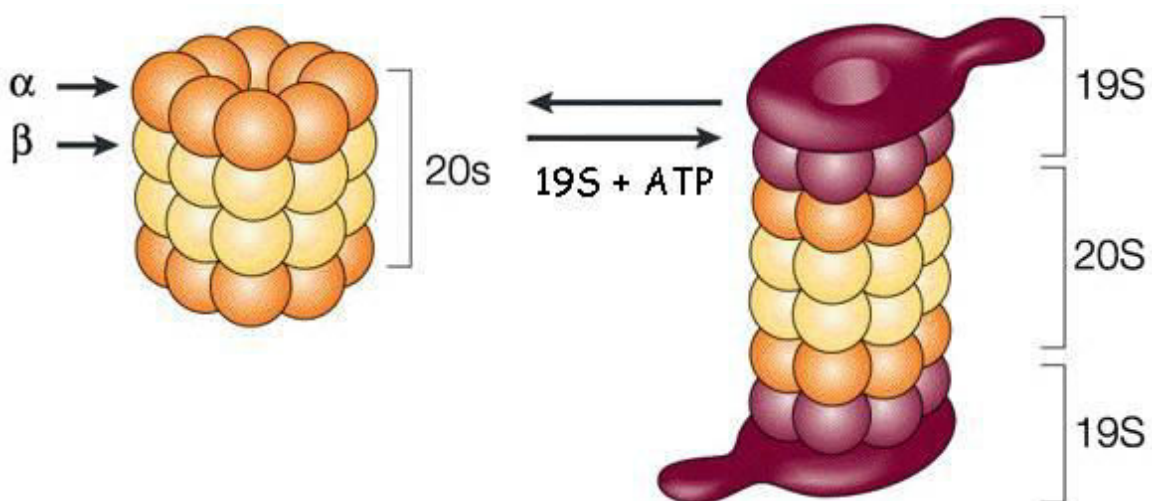


Figure 6: Représentation des différentes structures du protéasome 26S d'après Julian Adams (2004).

Ce système se révèle être capital dans la lutte contre l'agrégation des protéines. Ainsi en cas de dysfonctionnement ou de saturation de ce système, il peut y avoir accumulation et agrégation des protéines. Les conséquences pour la cellule sont alors très graves. Plusieurs éléments suggèrent qu'un dysfonctionnement de cette voie de signalisation est impliqué dans la

maladie de Parkinson. Comme décrit dans la partie histopathologie, des agrégats protéiques sont fréquemment retrouvés dans la maladie de Parkinson, et plusieurs études ont montré que les corps de Lewy contiennent de l'ubiquitine [38-40]. Il a d'ailleurs été démontré que l'injection d'un inhibiteur du protéasome comme la lactacystine conduit à la mort des neurones dopaminergiques dans des modèles animaux [41-43]. L'utilisation de 6-OHDA, une neurotoxine, qui injectée chez la souris provoque la mort des neurones dopaminergiques spécifiquement, a été montrée comme inhibant l'effet anti apoptotique de l' α -synucléine en bloquant sa dégradation par le protéasome, ce qui promeut son agrégation [44]. De plus, nous savons que, dans des formes sporadiques de la maladie de Parkinson, la fonction du protéasome est altérée par une diminution drastique de l'expression de la sous-unité α du complexe 20s [42, 45]. Les formes génétiques de la pathologie confirment le rôle du système ubiquitine ligase dans la pathologie. En effet plusieurs protéines dont les mutations entraînent l'apparition de la maladie participent à ce système. Il s'agit de la Parkine et d'UCHL-1 qui sont toutes deux des ubiquitines ligases. Cependant il a été montré que l' α -synucléine, le composant majeur des corps de Lewy n'est pas une cible du protéasome que ce soit pour les formes sauvages de la protéine ou des formes mutées, que l'on retrouve dans les cas de Parkinson génétique [46].

4. Origine de la maladie de Parkinson

Les origines de la maladie de Parkinson sont regroupées en deux grandes classes : les origines sporadiques dont on ne connaît pas la cause, à proprement parler, et qui représente 95% des cas ; et les formes génétiques qui représentent 5% des cas.

A. Les formes sporadiques

L'origine de ces formes sporadique est encore actuellement largement débattue. Cependant il semble qu'elles soient liées à des causes environnementales parfois doublées de facteurs de susceptibilités génétiques.

La première description du syndrome Parkinsonien lié à des causes environnementales date de la fin des années 1970 avec la découverte du MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydroxychlorine). C'est un sous-produit toxique de la synthèse d'une drogue opioïde le MPPP (1-méthyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine ou Desmethyprodine). Les consommateurs de cette drogue déclaraient souvent des syndromes Parkinsoniens. Des études *post-mortem* ont fait le lien entre la présence de MPTP et une dégénérescence du *locus niger* [47]. C'est une molécule lipophile capable de passer la barrière hématoencéphalique. Elle est alors métabolisée en MPP⁺ par la monoamine oxydase puis capturée par le transporteur membranaire de la dopamine dans les neurones dopaminergiques où elle inhibe le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à l'apoptose [48].

Cette découverte a ouvert la voie à de nombreuses études ayant montrées que plusieurs composés chimiques pouvaient entraîner l'apparition de syndromes parkinsoniens tels que : le paraquat [49], la roténone, les organochloriques, le pyréthroïde, le manganèse. Bien que leurs modes d'actions ne soient pas parfaitement connus, ces composés ont tous pour effets d'altérer la fonction mitochondriale et ainsi de conduire les cellules en apoptose.

Ces causes environnementales peuvent parfois être potentialisées par des facteurs de susceptibilités génétiques. Comme nous le verrons par la suite il existe des gènes dont les mutations entraînent l'apparition de la maladie de Parkinson. Ces gènes sont classés en fonction de leur mode de transmission : autosomique dominant ou récessif. La question se pose pour les

mutations hétérozygotes sur les gènes à transmission récessive. Bien que leurs rôles soient encore très débattus, il semble qu'elles agissent comme facteur de susceptibilité qui ne sont pas nécessaires et suffisants au déclenchement de la pathologie mais qui, mis en contact avec des facteurs de l'environnement peuvent faciliter l'apparition de la pathologie.

B. Les formes génétiques

Depuis les premières descriptions de la maladie de Parkinson, de nombreux travaux ont décrit l'existence de gènes impliqués dans le développement de la pathologie. Il en résulte qu'environ 5% des cas de syndrome Parkinsonien sont dus à des causes purement génétiques. Plusieurs gènes ont été liés à la pathologie et de nombreuses mutations sur ces gènes ont été montrées comme capables d'entraîner l'apparition de la pathologie.

Cet aspect de la maladie est actuellement très étudié car il ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre la physiopathologie de la maladie de Parkinson. A l'heure actuelle 16 *loci* sont associés à la maladie de Parkinson. Cependant les preuves de cette implication ne sont pas aussi fortes pour tous les gènes.

En effet, pour 6 d'entre eux, nous avons des résultats concluants concernant leur implication génétique dans la maladie. Il s'agit de l' α -synucléine, de LRRK2, de la parkine, de pink1 de DJ-1 et d'ATP13A2. Chacune de ces protéines conduit lorsqu'elles sont mutées ou anormalement exprimées, à une forme de Parkinson propre que l'on peut classer en fonction de plusieurs facteurs : sa transmission (autosomique dominante ou récessive), l'âge de départ et le tableau clinique.

Pour les autres gènes, leurs rôles dans la pathologie sont encore largement débattus.

Sept d'entre eux sont associés à la maladie, mais leurs rôles dans la pathologie sont débattus. Il s'agit d'UCHL-1, de GIGYF2, d'Omi et des gènes associés aux *loci* PARK3, PARK10, PARK12, PARK16.

Deux d'entre eux sont associés à des formes atypiques de Parkinson : PLA2G6 et FXB07.

Et enfin 2 gènes ont été découverts par une approche gène candidat : SCA2 et GBA.

Durant ma thèse je n'ai travaillé que sur deux protéines associées aux formes génétiques de la pathologie, c'est pourquoi je ne parlerai que d'elles : DJ-1 et la parkine.

Locus	Nom gène	du Position chromosomique	Transmission	Age d'apparition	Mutations
Loci associés à la maladie de Parkinson par des résultats concluants					
PARK1/PARK4	SNCA	4q21	Dominante	Précoce	A30P, E46K, A53T, Duplication/Triplication
PARK8	LRRK2	12q12	Dominante	Tardif	> 80 mutations non-sens, > 7 sont pathogéniques dont la mutation G2019S
PARK2	Parkin	6q25-q27	Récessive	Juvénile	Environ 170 mutations
PARK6	PINK1	1p35-p36	Récessive	Précoce	Environ 50 mutations
PARK7	DJ-1	1p36	Récessive	Précoce	Environ 15 mutations
PARK9	ATP13A2	1p36	Récessive	Juvénile	> 5 Mutations
Loci associés à la maladie de Parkinson mais sans résultats concluants					
PARK3	Inconnu	2p13	Dominante	Tardif	Inconnu
PARK5	UCHL-1	4p14	Dominante	Tardif	1 mutation
PARK10	Inconnu	1p32	Incertaine	Tardif	Inconnu
PARK11	GIGYF2	2q36-q37	Dominante	Tardif	7 mutations non-sens
PARK12	Inconnu	Xq21-q25	Incertaine	Tardif	Inconnu
PARK13	Omi/HTRA2	2p13	Incertaine	Tardif	2 mutations non-sens
PARK16	Inconnu	pq32	Incertaine	Incertain	Inconnu
Loci associés à des formes atypiques de la maladie de Parkinson					
PARK14	PLA2G6	22q12-q13	Récessive	Parkinson juvénile avec Dystonie et réponse à la levodopa	2 mutations non-sens
PARK15	FBX07	22q12-q13	Récessive	Précoce avec Syndrome Pyramidal	3 Mutations
Loci associés à la maladie de Parkinson par approche: gène candidat					
Non assigné	SCA2	12q24. 1	Dominante	Incertain	Expansion de motif CAG
Non assigné	GBA	1q21	Récessive	Incertain	

Tableau 1: Gènes associé à la maladie de Parkinson, d'après Corti et al, 2014

a. La protéine DJ-1

C'est en 2002 que le locus PARK7 a été associé à des formes juvéniles de maladie de Parkinson à transmission autosomales récessives [50]. En 2003, la même équipe a lié la protéine DJ-1 au locus PARK7 et mis en évidence son rôle dans la maladie de Parkinson [51]. Ce gène possède 8 exons, mais l'exon 1a/b n'est pas transcrit ce qui suggère un épissage alternatif [52]. La phase ouverte de lecture code pour une protéine de 189 acides aminés pour un poids moléculaire d'environ 20 kDa. Au niveau subcellulaire, nous retrouvons cette protéine aussi bien au niveau du noyau que du cytoplasme [53] que de la mitochondrie [54]. Au niveau de sa localisation tissulaire il existe une controverse, mais les derniers résultats indiquent que DJ-1 est une protéine ubiquiste présente au niveau du cerveau [13]. Elle est localisée dans les neurones [55] et aussi dans les cellules gliales [13]; cependant DJ-1 ne semble pas être un composant essentiel des corps de Lewy puisque seul un faible pourcentage d'entre eux sont positifs à un marquage [13, 55]. Il apparaît enfin que DJ-1 est plus exprimé dans les astrocytomes que dans les neurones [56]

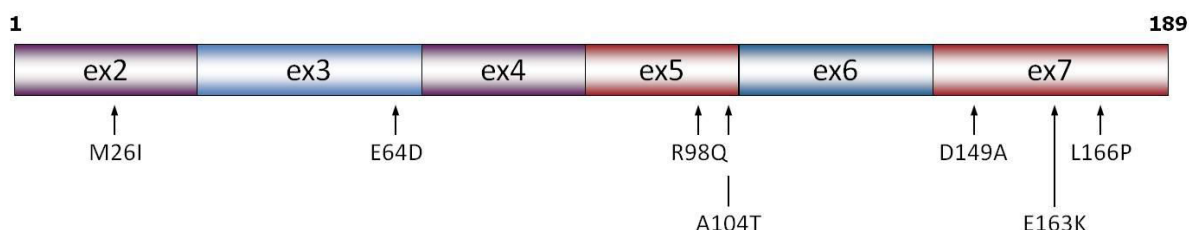


Figure 7: structure du domaine fonctionnel de DJ-1 faisant apparaître les exons et la position des principales mutations.

DJ-1 est une protéine au multiple rôle. Elle a tout d'abord été identifiée comme oncogène [53], puis fût associée au forme familiale de la maladie de Parkinson [51]. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée [57-60]. DJ-1 présente une forte homologie de séquence avec plusieurs enzymes bactériennes comme ThiJ, qui est impliqué dans la biosynthèse des thiamines, ou la protéase Pfp1 [51]. C'est un homodimère de la famille des peptidase C56 [61] et il apparaît que la protéine présente un domaine globulaire compact avec une Cystéine 106 sensible à l'oxydation. En effet, bien que sa fonction biochimique précise soit encore controversée, son rôle principal est d'agir comme un antioxydant [62, 63]. Cette fonction résulte de son transfert vers la mitochondrie où elle réduit le stress oxydatif induit par des dysfonctions de la chaîne respiratoire mitochondriale [62, 64]. Elle est capable d'éliminer les ROS (et notamment le peroxyde d'hydrogène) ce qui protège les neurones des dommages induits par les radicaux libres [65, 66]. En condition oxydative, il y a addition d'un groupement acide sulfinique qui entraîne sa localisation mitochondriale et ainsi son effet neuroprotecteur [62, 64]. Ce mécanisme n'est pas encore complètement élucidé mais cet ajout est à l'origine de la modification de sa fonction catalytique et donc son activation.

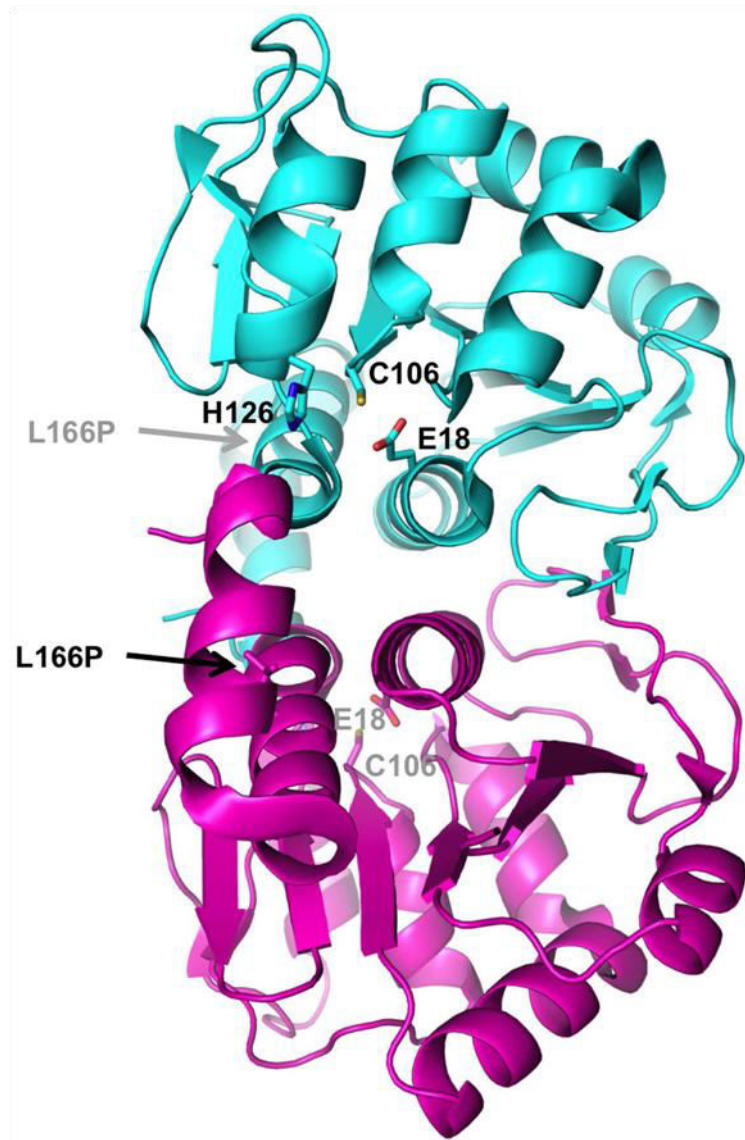


Figure 8: Structure tridimensionnelle de DJ-1 faisant apparaître sa conformation dimérique ainsi que la position de la cystéine 106 sensible à l'oxydation et plusieurs mutations. (d'après Trempe et al., 2013)

DJ-1 présente également une forte homologie de séquences avec les protéines HSP ou YajL [67]. Ceci suggère que cette protéine pourrait posséder une fonction de chaperonne. Dans une étude de 2004, Shendelman confirme ce postulat [68] ; DJ-1 est une chaperonne capable d'inhiber l'agrégation d' α -synucléine ; ce rôle étant lui aussi dépendant de ses propriétés redox [68]. En effet, en cas de mutation de la cystéine 106, il y a perte de la sensibilité à l'oxydation et abolition de cette fonction.

DJ-1 dans la maladie de Parkinson.

Bien que très rare, les formes familiales de la maladie de Parkinson liées à DJ-1 se caractérisent par une transmission autosomale récessive, un début précoce (pouvant être inférieur à 30 ans), une progression lente, et une bonne réponse à la levodopa. Chez ces patients, on observe des troubles psychiatriques (anxiété et épisodes psychotiques) [69], des troubles du comportement, une dystonie de fonction, également une petite stature et une Brachydactylie [70]. Cependant, DJ-1 n'est pourtant pas retrouvé (ou très peu) dans les corps de Lewy [13] et on ne

retrouve pas de mutation de DJ-1 dans les formes sporadiques de la maladie [52, 71]. Par contre, il y a dans les formes sporadiques de la maladie une augmentation du taux de forme insoluble de DJ-1 [72].

Plusieurs mutations de DJ-1 ont été découvertes dans les formes familiales de la pathologie. La mutation L166P conduit à une protéine mal repliée en C-terminal ce qui inhibe sa dimérisation et augmente sa dégradation par le protéasome [61, 73, 74]. Ceci engendre la réduction de l'effet neuroprotecteur de DJ-1 [66]. Cependant, ces formes mutées ont la particularité d'interagir avec la parkine, une ubiquitine ligase que je décrirai dans le chapitre suivant. Ceci provoque leurs stabilisations et leurs accumulations dans les cerveaux de patients atteints de formes génétiques liées à DJ-1 mais pas dans les cerveaux des patients atteints de formes liées aux mutations de la parkine, ce qui suggère une inhibition de leurs dégradations par les mutations [72]. Cette mutation peut aussi conduire à une localisation cellulaire altérée en faveur du compartiment cytoplasmique à défaut du compartiment mitochondrial [75].

De nombreuses autres mutations ont été mises en évidence dans la maladie de Parkinson, elles conduisent pour la plupart à une protéine mal repliée et inactive qui ne peut donc pas jouer son rôle d'antioxydant comme montré dans le tableau 1.

Mutations	Type	Effet	Références
M26I	Ponctuelle homozygote	Perturbation structurelle conduisant à une déstabilisation et à une inhibition de l'activité antioxydante	Abou-Sleiman et al., 2003
E64D	Ponctuelle homozygote		Bonifati, 2004
R98Q	Homozygote		Hague et al., 2003
A104T	Ponctuelle Hétérozygote		Hague et al., 2003
D149A	Ponctuelle Hétérozygote		Abou-Sleiman et al., 2003
E163K	Homozygote	Inconnue	Amnesi et al., 2005
L166P	Ponctuelle homozygote	Inhibition de la dimérisation	Bonifati et al., 2003
Délétion exons 1-5	Homozygote	Perte de la Protéine	Bonifati et al., 2003
Délétion exons 5-7	Hétérozygote	Protéine aberrante	Hedrich et al., 2004
g,168_185dup	Homozygote	Inconnue	Amnesi et al., 2005

Tableau 2: Liste de mutation de DJ-1 caractérisé dans la maladie de Parkinson.

b. La Parkine

La parkine est une protéine associée aux formes autosomales récessives de la maladie de Parkinson. Elle a été caractérisée pour la première fois en 1999 par l'équipe du docteur Kitada qui a mis en évidence l'implication du locus Park2 dans des formes précoces de maladie Parkinson

[76]. Le gène de la parkine se trouve sur le chromosome 6 et contient 12 exons. Il existe trois isoformes de la parkine de trois tailles différentes, la plus longue étant une protéine de 465 acides aminés.

Cette protéine est ubiquiste mais elle est retrouvée majoritairement au niveau du système nerveux central [77]. Dans le SNC, elle est présente principalement au niveau des ganglions de la base et dans la *substantia nigra* [78]. Au niveau cellulaire, elle est retrouvée dans la majorité des organelles intracellulaires et principalement dans le cytoplasme, les mitochondries et le noyau [77, 79, 80].

Parmi les trois isoformes de la parkine, la plus lourde (52 kDa) est celle qui semble porter la majeure partie de l'activité. C'est une protéine de 465 acides aminés qui appartient à la famille des protéines à doigts de zinc. Elle possède en N-terminal un domaine UBL (Ubiquitin Like Domain) capable de fixer l'ubiquitine suivi de trois domaines RING (Really Interesting New Gene) R0, R1 et R2. Entre les domaines R1 et R2 se situe un domaine IBR (In Between Ring) [81]. Ses domaines sont capables de réagir avec les ions Zn^{2+} [82] et semblent être responsables de son activité catalytique. Cette structure est caractéristique des ubiquitine ligase E3 ce qui est la première fonction de la parkine à avoir été décrite.

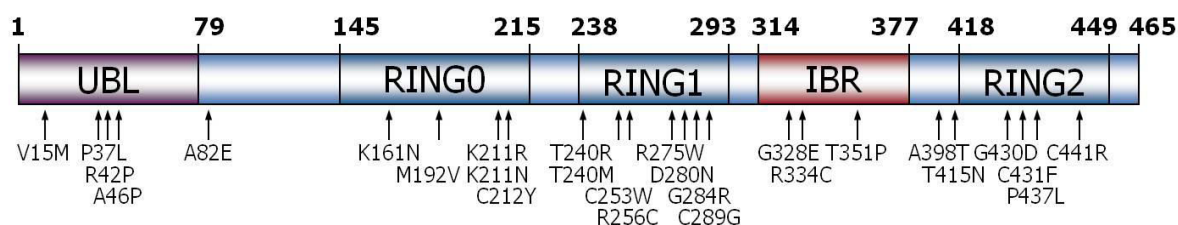


Figure 9: Structure de la parkine faisant apparaître les domaines UBL, R0, R1, IBR et R2. Sont représentées, en dessous, la position des principales mutations retrouvées dans la maladie de Parkinson.

Fonction ubiquitine-ligase de la parkine.

La parkine est une E3 ligase, c'est-à-dire qu'elle catalyse la fixation de motifs ubiquitines sur les protéines cibles (voir figure 5). Elle participe ainsi au système ubiquitine-protéasome décrit précédemment. L'étude de sa structure s'est révélée capitale dans la compréhension de son activité. Son domaine R1-IBR-R2 est typique des E3 ligases et se retrouve dans plusieurs autres protéines de ce type comme HOIP, HOIL et Dorfin [83]. L'interaction de ce domaine avec des atomes de zinc via des boucles protéiques riches en cystéines est responsable de son activité d'ubiquitination. La plupart des modèles d'interactions entre la parkine et ces cibles sont aujourd'hui très débattus mais une semble faire consensus. Il semble que deux atomes de zinc interagissent avec le domaine RING2 formant deux boucles comprenant chacune quatre cystéines [84]. La découverte du domaine R0 est plus récente et pose la question de son rôle. Il semble que ce domaine joue un rôle dans le positionnement des domaines R1 et R2. La parkine est capable de réaliser des mono- ou des poly-ubiquitinations. Elle peut fixer des motifs uniques en différents endroits de la cible [85, 86]. Le cas des poly-ubiquitination est plus complexe. En effet, le substrat de la parkine peut être une protéine, mais également une autre molécule d'ubiquitine. Elle peut ainsi aussi bien rajouter un motif ubiquitine sur une molécule d'ubiquitine [87, 88], ou au contraire, fixer des chaînes complexes directement [89, 90]. Le rôle exact de ces différents types d'ubiquitination est actuellement débattu mais il semble que cela permette une régulation différentielle de chaque cible.

Pour ce qui est du rôle précis de la parkine dans la cellule, il est encore aujourd'hui en parti méconnu mais de nombreuses cibles de son ubiquitination ont été décrites [91, 92]. Passer

en revue toutes ces cibles n'est pas ici l'objet de mon propos, je me contenterai donc de citer les grands mécanismes principaux dans lesquels cette fonction est impliquée.

Le contrôle du cycle cellulaire : Tout d'abord, il existe une expression différentielle de PARK2 au cours du cycle : péri-nucléaire à l'interphase, elle est observée au niveau du centrosome et du fuseau mitotique pendant la mitose et au niveau de l'anneau contractile pendant la cytokinèse [93]. La parkine diminue l'expression de la cycline E [94, 95]. Une surexpression de la parkine bloque la cellule en G0/G1 [96]. Enfin, comme décrit précédemment la parkine interagit avec les microtubules et contrôle la dynamique du fuseau mitotique notamment via son recrutement via HDAC6, participant ainsi à la mitose [97-99]

Le transport axonal : en régulant la dégradation de la tubuline, la parkine modifie la dynamique du réseau de microtubules. Elle se lie aux molécules de tubuline via ces domaines R0, R1 et R2 [100] et empêche la dépolymérisation induite par des toxines [101]. Elle est également capable d'ubiquitiner la tubuline ce qui induit la dépolymérisation des microtubules [102]. Il semble donc qu'elle joue un rôle dans la balance entre stabilisation et dépolymérisation des tubules qui sont des éléments clés du maintien de l'intégrité cellulaire.

La transmission synaptique : en régulant des protéines associées aux vésicules synaptiques et plus particulièrement au complexe SNARE comme CDCrel-1, PaelR et les synaptogamines.

La fonction mitochondriale : La mitochondrie est une structure cellulaire relativement indépendante qui se divise par fission. Une mitochondrie va ainsi en donner deux à la suite de la réplication de l'ADN mitochondrial. A l'inverse, il existe un mécanisme de fusion mitochondrial impliquant deux mitochondries en cas de dommage chez l'une ou l'autre. Cependant, en cas de dommage trop important, une mitochondrie peut induire sa fission de manière contrôlée, pour finalement être dégradée dans le cadre du processus d'autophagie (appelé ici spécifiquement mitophagie). Le contrôle de ces deux mécanismes est donc fondamental dans le cadre d'une maladie mitochondriale comme la maladie de Parkinson. Une étude morphologique montre que la parkine est capable de moduler la forme des mitochondries et de diminuer le gonflement, la rupture et l'apoptose induits par un stress sur des cellules PC12 [103].

L'étude des mécanismes moléculaires montre que la parkine et PINK1 sont impliqués dans une voie de signalisation qui contrôle la dynamique mitochondriale. PINK1 (PTEN Induced Kinase 1) est une kinase que l'on retrouve au niveau mitochondrial. Lors du mécanisme de fission, il y a dépolarisation de la membrane mitochondriale, ce qui a pour effet d'activer PINK1 qui va alors phosphoryler la parkine. Ceci provoque son activation et son recrutement à la mitochondrie [104, 105]. Une fois activée, la parkine agit comme un répresseur sur Drp-1 une GTPase impliquée dans la fission mitochondriale [106, 107]. Fis1, un facteur de fission mitochondrial est aussi une cible de la parkine [108]. De plus, la parkine entraîne la dégradation des mitofusines [104, 105]. Ce sont des protéines dont la fonction est de permettre la fusion mitochondriale et ainsi promouvoir leur survie. En provoquant la dégradation, la parkine empêche la refusion des mitochondries. La parkine joue donc un rôle fondamental dans la mitochondrie et a pour effet d'inhiber les voies de fusion et d'activer les voies de fission, faisant pencher la balance en faveur de ce mécanisme qui conduit finalement à la dégradation de celles-ci par autophagie.

L'apoptose : Je décrirai dans la partie 5 du chapitre 1 le mécanisme de l'apoptose plus en détail. Il est toutefois nécessaire de décrire ici le rôle anti-apoptotique de la parkine. Elle est capable de modifier le seuil de relargage du cytochrome C, les niveaux d'expression de parkine étant d'ailleurs inversement liés à la présence de celui-ci dans [109-115] le cytosol [116]. Elle est également capable de protéger la cellule des effets toxiques entraînés par les drogues induisant les MAPKines. En effet, la parkine est capable de diminuer l'activation des MAPK et notamment de c-JUN, Erk (Extracellular signal-Related Kinase), et p38 [101]. Elle joue également un rôle sur

l'apoptose induite par l'accumulation de protéine. En effet, elle entraîne la dégradation du récepteur Pael. Il s'agit d'une petite protéine G qui peut, lorsqu'elle est trop exprimée, s'accumuler et s'agréger dans la cellule entraînant une mort par apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique. L'agrégation de cette protéine est d'ailleurs fréquemment observée dans la maladie de Parkinson. La dégradation par la parkine protège la cellule de cet effet néfaste [117].

Fonction d'ubiquitine ligase et rôle dans la maladie de Parkinson.

Plus de 100 mutations du gène PARK2 ont été répertoriées dans la maladie de Parkinson, incluant des mutations faux-sens, non-sens, des délétions des réarrangements et des duplications [109-115]. Ces mutations sont responsables de près de 50% des formes autosomales récessives de la pathologie [76]. Elles se caractérisent par un début très précoce avec un âge pouvant être inférieur à 30ans.

Ces mutations sont responsables de la perte de fonction de la Parkine qui ne va plus jouer son rôle protecteur sur la survie cellulaire. En effet, incapable de marquer les protéines devant être dégradées, elle entraîne une augmentation de la toxicité de la dopamine via sa fonction sur la transmission synaptique, de l'agrégation d' α -synucléine et de un dérèglement du réseau mitochondrial ce qui conduit à une apoptose accrue.

Une hypothèse fréquemment avancée est que la parkine mutée ne joue plus son rôle répresseur sur la cycline E. Cette levée d'inhibition pousse les neurones à se diviser. Mais un neurone dopaminergique est bien trop différencier pour conserver une capacité de division. Une fois ce processus activé, le neurone, incapable de le terminer entre en apoptose. Toutefois, les résultats sur la cycline E étant encore discutés il est difficile d'obtenir un consensus clair à ce sujet. En effet, une étude décrit justement que la parkine n'a pas d'effet sur la cycline E [118], suggérant peut-être une action tissu-spécifique.

Fonction de facteur de transcription : Nouvelle avancé et rôle dans la maladie de Parkinson.

Récemment, une nouvelle fonction de la parkine a été mise en évidence au sein du laboratoire. La parkine est un facteur de transcription. Comme beaucoup d'ubiquitine ligase à doigts de zinc, la parkine possède une structure pouvant potentiellement se fixer à l'ADN.

La première cible mise en évidence a été p53 en 2009. La parkine possède la capacité de se fixer sur le promoteur de p53 et de réprimer sa transcription [119]. Ceci entraîne une série de réponses cellulaires et notamment une inhibition de l'expression de la caspase-3 qui est un marqueur de l'apoptose. Cette étude apporte ainsi des éléments solides au rôle anti-apoptotique de la parkine.

La nitrosylation de la parkine par les NO-synthase est capable de réguler la localisation de la parkine en faveur du compartiment cytoplasmique ce qui inhibe son activité sur la transcription de p53 [120].

Bien que peu étudié pour l'instant, cette nouvelle fonction joue un rôle dans la maladie de Parkinson. En effet, dans l'étude de 2009, l'utilisation de mutants de la parkine abolit l'effet sur p53. Ainsi en condition physiologique, la parkine inhibe p53, et par la même son rôle dans la mort cellulaire par apoptose. Mais en condition pathologique, quand la parkine est mutée il y a levée de cette inhibition entraînant un tonus apoptotique supérieur maintenu. De plus, la maladie de Parkinson se caractérise par un fort stress oxydatif. Ceci se caractérise par des oxydations et aussi des nitrations de nombreux substrats. Or, la parkine nitrosylée est incapable de jouer son rôle répresseur sur p53 et donc sur l'apoptose.

5. p53 et apoptose

A. L'apoptose

L'apoptose est une des voies de mort cellulaire génétiquement programmée. Tout au long de la vie de l'organisme ce mécanisme est en équilibre avec celui de prolifération et sert au maintien de l'homéostasie tissulaire. C'est un phénomène parfaitement régulé et physiologique que l'on retrouve tout au long du développement où il contribue au développement du système nerveux et à la disparition de la palmure des mains. Cependant, ce mécanisme peut également être initié pour détruire des cellules endommagées (rayonnement UV qui endommage l'ADN) ou soumise à un stress devenu impossible à surmonter (accumulation de protéines). Ce mécanisme est à opposer à la nécrose qui est un phénomène passif et désorganisé associé à l'hypoxie, aux toxines et aux brûlures.

La cellule apoptotique subit une série de modifications qui conduisent à son élimination finale. Pour cela, elle va subir des changements morphologiques et physiologiques importants. Tout d'abord ; la cellule va se détacher du tissu auquel elle appartient, il y a rupture de l'adhésion cellulaire. Ensuite, on note une diminution du volume cellulaire suite à la compaction du noyau et du cytoplasme. La mitochondrie peut ensuite être touchée, il y a diminution de son potentiel de membrane et ouverture de ces pores ce qui conduit au relargage du cytochrome C. L'ADN nucléaire est alors fragmenté, et la membrane plasmique bourgeonne. C'est la dernière étape de l'apoptose qui conduit à la formation de vésicules, les corps apoptotiques qui sont phagocytés par les macrophages grâce à l'externalisation de phosphatidylsérine à leur membrane [121]. Durant tout ce processus il est important de noter que la membrane plasmique reste intacte contrairement au mécanisme de nécrose. Il n'y a donc pas de relargage de facteurs pro-inflammatoires ce qui réduit l'inflammation locale.

L'apoptose est classée en trois types différents. L'apoptose de type I qui comprend les voies intrinsèques, extrinsèques et réticulaires, de type II qui correspond à l'autophagie lysosomiale et le type III correspondant à une voie non lysosomiale [122].

a. L'apoptose de Type I

L'apoptose de type I est elle-même subdivisée en trois sous-ensembles. Bien qu'ils conduisent tous à une mort cellulaire, la cause et le déroulement de ces voies sont différents.

La voie intrinsèque :

Dans la voie intrinsèque, la mitochondrie joue un rôle clé. Elle est activée par différents facteurs comme la fragmentation de l'ADN, l'arrêt de l'activation des voies de survie, des stress dont le stress réticulaire, les UV ou encore des toxines. La super famille des protéines de Type BCL-2 jouent ici un rôle clé. Ces protéines sont des protéines membranaires qui peuvent être soit pro-apoptotiques (comme Bax, BAD, Bak ou Bok) soit anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w ou Nr13). En condition normale, les protéines anti-apoptotiques inhibent l'ouverture des ports membranaires (VDAC) garantissant ainsi le potentiel de membrane et empêchant le relargage du cytochrome C [123, 124]. En condition apoptotique se sont les protéines comme Bax qui sont activées et qui conduisent à une ouverture des canaux VDAC induisant un dérèglement du potentiel de membrane et un relargage du cytochrome C dans le cytoplasme. Une fois dans ce compartiment, il se lie à d'autres protéines (APAF1, de deux procaspase-9) formant un complexe nommé apoptosome. Une fois formé ; il libère la caspase 9 qui active ensuite la caspase 3.

La voie extrinsèque :

Dans cette voie se sont des facteurs extérieurs les ligands de mort qui viennent se fixer sur des récepteurs de mort cellulaire. Cela conduit à l'activation de la procaspase 8 en caspase 8 qui active à son tour la caspase 3.

Les caspases sont des protéases à cystéine extrêmement bien conservées dans l'évolution. Elles sont divisées en deux groupes, les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) et les caspases effectrices (3, 6 et 7). L'activation des caspases induit le clivage de nombreux substrats. Dans le cas évoqué précédemment, c'est la caspase 3 qui est l'effecteur final des deux voies qui va alors lyser différents substrats conduisant *in fine* à la mort cellulaire [125].

La voie réticulaire :

Cette voie repose également sur une cascade d'événements dont les effecteurs finaux sont également les caspases. Cette voie est activée lorsque le système de réponse aux protéines mal repliées UPR (Unfolded Protein Response) n'est plus capable de gérer la quantité de protéines mal repliées. En condition physiologique, le système UPR joue le rôle de senseur du stress protéolytique. Si trop de protéines sont mal repliées, elles peuvent s'agréger et conduire à des dégâts pour la cellule mais également pour l'ensemble du tissu adjacent. Une fois le stress détecté, ce mécanisme conduit à la synthèse de protéines chaperonnes de manière à endiguer le problème. S'il y a trop de protéines mal repliées et que le système UPR n'est pas capable de régler le problème, alors cette voie de l'apoptose entre en jeu.

b. L'apoptose de type II

Elle correspond à la voie lysosomiale de l'autophagie. Il convient tout d'abord de définir l'autophagie. A l'origine ce mécanisme a été considéré comme une forme de mort cellulaire. Cependant de récentes études ont montré un rôle beaucoup plus large de l'autophagie qui peut être une réponse de survie bénéfique pour la cellule [126]. C'est un mécanisme complexe par lequel la cellule recycle ses organelles et ses protéines. L'autophagie a lieu lors de périodes de stress et notamment lorsque la quantité de nutriment est faible [127] ou en cas de stress oxydatif [128] et elle est alors bénéfique permettant de lutter contre ces problèmes. Cependant nous ne traiterons ici que de l'autophagie dans le cadre de la mort cellulaire programmée. L'autophagie bénéfique et celle apoptotique se différencie par la proportion de la cellule touchée par le mécanisme et la finesse de sa régulation [129].

Elle existe sous deux formes [130].

La macro-autophagie est caractérisée par la récupération d'organelles cytoplasmiques au sein d'une structure possédant une double membrane, les autophagosomes, qui sont ensuite dirigés vers le compartiment de dégradation lysosomal [131].

L'autophagie sous le contrôle des chaperonnes (ou CMA) semble intervenir à un niveau plus petit directement sur les protéines et implique la présence d'un pentapeptide LysPheGluArgGln dans la structure de la protéine cible [132].

B. p53.

P53 est une protéine découverte pour la première fois en 1979 suite à une infection par SV40 [133-136]. C'est une protéine de 53 kDA dont le gène, très conservé dans l'évolution, est situé sur le chromosome 17p13.1 chez l'homme.

P53 facteur de transcription

P53 agit comme un facteur de transcription [137, 138], capable de réguler un nombre important de cibles. Citer tous ces gènes serait de peu d'intérêt mais nous pouvons les classer en fonction du processus cellulaire dans lequel ils sont impliqués : réparation de l'ADN, cycle cellulaire, angiogenèse, tumorigenèse, autorégulation et apoptose.

En condition physiologique, p53 est très faiblement exprimé, et se lie à une protéine Mdm2 [139]. C'est une ubiquitine ligase dont l'expression est sous le contrôle transcriptionnel direct de p53. Elle ubiquitine p53 ce qui a pour effet sa dégradation par le protéasome [140]. Soumis à différents stimuli et signaux de stress, la protéine p53 est activée. Sa durée de vie est alors augmentée ce qui entraîne une accumulation de cette protéine. Elle subit également différentes modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, ou la sumoylation, et surtout une phosphorylation de ces résidus N-terminaux. Cette dernière modification conduit à son activation complète et à un changement de conformation qui permet sa liaison à l'ADN. Les kinases responsables de ces modifications font parties de deux groupes, les MAPK (JNK1-3, ERK1-2, p38 MAPK) qui sont induites en condition de stress et un second groupe responsable du contrôle de l'intégrité du génome (ATR, ATM, CHK1, CHK2, DNA-PK, CAK, TP53RK). En cas d'activation, p53 conduit à un arrêt du cycle cellulaire. C'est un phénomène transitoire dû à l'accumulation de p53. Si le stress peut être contrôlé, la cellule met tout en œuvre pour régler le problème comme c'est le cas notamment lors des erreurs de réplication de l'ADN ou les mutations de celles-ci induites par les UV. Si le problème est réglé alors le taux de p53 diminue et le cycle reprend. On comprend alors pourquoi p53 est nommé le gardien du génome [141]. Si ce n'est pas le cas, le taux de p53 reste élevé et la cellule entre alors en apoptose. P53 est capable d'induire les trois voies de l'apoptose de type I. Il peut activer la voie intrinsèque en interagissant et activant avec les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 comme Bax conduisant à la mort cellulaire comme décrit précédemment.

La protéine p53 est également impliquée dans le mécanisme d'autophagie. Dans ce contexte le rôle de p53 est ambivalent puisqu'il peut aussi bien promouvoir ou inhiber l'autophagie. Ainsi, dans des cellules avec un faible taux d'autophagie, p53 est capable de l'augmenter [142], alors que dans un modèle de cellule où l'autophagie est à un taux élevé p53 le diminue [142]. Plus spécifiquement, il semble que ce soit la localisation et l'activation de p53 qui dicte son rôle. Ainsi quand p53 est activé et localisé dans le compartiment nucléaire, il promeut l'autophagie alors que les formes inactives cytoplasmiques l'inhibent [143, 144].

C. P53 et l'apoptose dans la maladie de Parkinson

L'importance de l'apoptose dans la maladie de Parkinson est maintenant très bien connue [145]. Il y a des éléments qui décrivent à la fois la survenue d'une mort cellulaire de type I et de type II dans cette pathologie.

Des études ont montré une fragmentation de l'ADN dans les cerveaux de patients atteints par la maladie [146-150]. De plus, des marqueurs moléculaires de l'apoptose sont présents chez ces patients. Ils sont caractéristiques des différentes voies du type I de l'apoptose. Il s'agit de p53 et de CD95 [151], de la caspase 3 [45, 152], et de la caspase 9 [153], des membres de la superfamille de Bcl-2 [154] qui sont caractéristiques de la voie intrinsèque. La caspase 8 [155] et TNF- α [154] sont des marqueurs de la voie extrinsèque. Enfin, l'augmentation des niveaux de phospho-PERK, d'eIF2- α et de ATF4 suggère que la voie de réponse réticulaire est également impliquée [156].

Il existe également des marqueurs de l'apoptose de Type II. Une étude de 1997 montre une mort par autophagie des neurones du *locus niger* [149].

Intéressons-nous maintenant plus en détail aux causes de cette mort cellulaire dans la maladie de Parkinson. Comme décrit précédemment, la maladie de Parkinson se caractérise par la mort des neurones dopaminergiques. Or, plusieurs études ont mis en évidence que la dopamine induit l'apoptose dans des modèles neuronaux [157-159], mais également dans d'autres cellules [160]. De plus, la 6-hydroxydopamine, une neurotoxine dérivée de la dopamine induit une forte augmentation de l'apoptose [153, 161]. De même le MPTP décrit précédemment comme une neurotoxine pouvant produire les symptômes de la maladie de Parkinson est connu pour induire lui aussi l'apoptose [162]. Ces résultats sont confirmés *in vivo* par une étude de 1997 réalisée chez la souris pour le MPTP [147] et par une étude de 2000 chez le rat pour la 6-OHDA [163].

Cependant, on peut se poser la question pourquoi l'apoptose touche spécifiquement les neurones dopaminergiques. Il ne faut pas oublier que la voie de biosynthèse de la dopamine est génératrice de ROS qui sont sources d'un important stress oxydatif. En effet, le métabolisme de la dopamine est générateur de ROS, aussi bien par auto-oxydation que sous l'effet de la monoamine oxydase, qui vont induire un très fort stress oxydatif. L'ajout d'antioxydant dans le milieu, comme le N-acetyl-L-cystéine (NAC) ou le dithiothréitol (DTT), permet d'ailleurs de diminuer la mort par apoptose [157, 159, 164-166].

De plus, comme montré précédemment, il y a une forte agrégation protéique dans la maladie de Parkinson. Cette agrégation s'accompagne d'une inhibition du protéasome. Les dysfonctions du protéasome sont souvent accompagnées d'une mort cellulaire comme le montre l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, la lactacystine [167, 168]. L'activité du protéasome est d'ailleurs très fortement réduite dans la maladie de Parkinson conduisant à une forte apoptose [45] via l'activation de la voie réticulaire.

Mon projet se concentrant principalement sur la parkine et p53, il convient maintenant de s'intéresser au rôle de p53 dans la maladie de Parkinson et plus particulièrement dans l'apoptose.

Une étude réalisée sur des cerveaux de patients Parkinsoniens montre que l'expression de p53 est augmentée dans le noyau caudé mais pas dans la substance noire [169].

Comme expliqué précédemment, les deux mécanismes majeurs conduisant à l'apoptose dans les cerveaux Parkinsoniens sont le stress oxydatif et l'inhibition du protéasome. P53 est une protéine dont la dégradation est sous le contrôle du protéasome [139]. La baisse de l'activité de dégradation du protéasome conduit à une accumulation de cette protéine [170], qui conduit à une apoptose cellulaire [171]. Une autre étude montre quant à elle que p53 subit une nitrosylation dans des cellules soumises à un stress oxydatif [172] ou à l'utilisation du 6-OHDA [173]. Cette nitrosylation a pour effet de le stabiliser ce qui augmente ces effets pro-apoptotiques. L'inhibition de p53, par une approche d'ARN interférence [174], ou par l'utilisation d'inhibiteur pharmacologique [175], protège d'ailleurs les cellules d'une apoptose induite par le 6-OHDA. L'utilisation de MPP+ provoque une augmentation de l'expression de p53 [176] conduisant à la mort des cellules. Cette effet est reversé dans des cellules KO pour p53 [177].

En plus de cette implication de p53 dans l'apoptose observé dans la maladie de Parkinson, il existe d'autres éléments liant fortement p53 et cette pathologie. En effet, p53 interagit avec plusieurs des protéines caractérisées dans les formes génétiques de la maladie de Parkinson.

DJ-1 est connu pour réprimer l'expression de p53 [178, 179], que ce soit au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel [180], qu'au niveau de son activité [181]. Cependant, une étude montre un résultat opposé, DJ-1 pouvant être un activateur de l'expression de p53 [182]. En retour p53 exercerait un rétrocontrôle sur DJ-1 en provoquant une phosphorylation post-traductionnelle de la protéine. Il en résulterait une inhibition de sa fonction d'antioxydant ce qui conduit à une exacerbation du phénomène d'apoptose [183].

La parkine quant à elle est une ubiquitine ligase de type E3. Cependant, une nouvelle fonction a été mise en évidence. La parkine est capable de se fixer sur le promoteur du gène de p53 et de réprimer sa transcription [119]. Ce résultat est confirmé par une étude de 2013, la parkine est nitrosylée ce qui contrôle sa translocation au noyau et modifie sa capacité à réprimer l'expression de p53 [120].

L' α -synucléine est le composant majeur des corps de Lewy. Cette protéine est capable de diminuer l'expression de p53 possède ainsi un effet neuroprotecteur [46, 184].

II. La Maladie d'Alzheimer

La Maladie d'Alzheimer (MA) est la première maladie neurodégénérative par ordre de prévalence. Elle a été décrite pour la première fois par Alois Alzheimer en 1906 après l'étude du cas d'une femme de 51 qui souffrait de troubles de la mémoire et de l'orientation. Il s'intéressa aux modifications d'ordre anatomique de son cerveau et fût le premier à décrire des dépôts denses extracellulaires et des inclusions intracellulaires.

1. Epidémiologie

En France, en 2012, la maladie d'Alzheimer touche près de 850000 personnes soit près de 1.3% de la population. Les estimations sont alarmantes et tablent sur une progression rapide avec 1275000 malades en 2020 et 2150000 en 2040. En 2020, la pathologie devrait ainsi toucher un français sur 4 de plus de 65 ans. Avec l'augmentation de l'espérance de vie, cette maladie devient un véritable fléau pour nos sociétés vieillissantes. En effet, en plus du nombre de malades il faut aussi compter le nombre de personnes atteintes indirectement par la pathologie qui est estimé à 3000000. Le coût pour la société est donc très important (source France Alzheimer).

2. Histopathologie.

Tout comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer est une atteinte neurodégénérative. Mais contrairement à la maladie de Parkinson, la perte des neurones n'est pas concentrée dans une seule et même zone mais touche tout le cortex cérébral, avec une très forte dégénérescence de l'hippocampe, une des zones clés du processus mémoriel.

Au niveau histologique, deux types de lésions ont été décrites. Il s'agit des dégénérescences neurofibrillaires et des dépôts amyloïdes.

Les dégénérescences neurofibrillaires sont des lésions intracellulaires composées de protéines Tau hyperphosphorylées. La protéine Tau fait partie de la famille des protéines associées aux microtubules. Elle est capable d'interagir avec les microtubules et contrôle leurs stabilités [185-188], ainsi que le transport tubulaire [189, 190]. C'est une protéine que l'on retrouve principalement au niveau neuronal dans la partie distale des axones, et très peu au niveau des dendrites. Le contrôle de la protéine Tau s'effectue au niveau post-traductionnel par des phosphorylations. Elle présente plus de 80 sites de phosphorylations potentiels. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est hyperphosphorylée ce qui conduit à son détachement des microtubules. Ceci a deux conséquences majeures :

- La première est la déstabilisation du réseau de microtubules [191].
- La seconde est l'agrégation : les protéines Tau hyperphosphorylées possèdent un fort pouvoir agrégeant et vont se lier entre elles, mais également avec les formes non phosphorylées, entraînant la formation d'inclusions intracytoplasmiques toxiques [192] (gain de fonction toxique).

Les dépôts Amyloïdes, ou plaques séniles, sont des amas protéiques extracellulaires. Elles sont majoritairement composées de peptide β -amyloïde ou $A\beta$. Le peptide $A\beta$ est un produit de

clivage de la protéine précurseur amyloïde (APP). Je détaillerai dans la partie 5 ce clivage et ses conséquences pour la cellule.

3. Symptômes

La maladie d'Alzheimer est une maladie progressive et incurable. Elle se caractérise par une perte progressive des capacités cognitives du patient. La principale fonction altérée est la mémoire. Cela se traduit par une perte progressive des souvenirs et par l'impossibilité d'en mémoriser de nouveau. Les souvenirs les plus anciens sont cependant relativement préservés. Lorsque la maladie s'étend, d'autres fonctions peuvent être atteintes comme par exemple des difficultés dans l'exécution des gestes (apraxie), une perte des mots et des difficultés à parler (aphasie), une incapacité à reconnaître des personnes ou des objets (agnosie). Il en résulte une confusion, une désorientation, une dépression, une irritabilité voir même une agressivité du patient.

4. Origines de la maladie

Tout comme pour la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer peut-être de deux origines. Il existe des formes sporadiques qui touchent près de 99% des patients, et des formes héréditaires qui représentent 1% des cas.

A. Les formes sporadiques à début tardif

L'origine exacte des formes sporadiques est inconnue. La pathologie présente dans ce cas un début tardif (plus de 65 ans). Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés [193].

Les traumatismes cérébraux entraînent une perte de l'intégrité tissulaire et contribuent aux pathologies A β et Tau.

Les accidents vasculaires cérébraux et de manière générale toute les atteintes du système vasculaire. Elles provoquent des lésions tissulaires, une inflammation et augmentent les dépôts amyloïdes.

L'hypertension est la cause d'une rupture de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique ce qui conduit à l'invasion du tissu cérébral par des protéines du plasma. Elles y provoquent une toxicité qui favorise l'apoptose et l'accumulation du peptide amyloïde.

Le diabète de Type II. Il provoque la formation de produits de glycosylation avancés [194]. Ces produits sont reconnus par les plaques amyloïdes via des récepteurs spécifiques. La glycosylation de l'A β accélère son agrégation [195]. De plus, il y a compétition entre l'insuline et le peptide amyloïde pour la même enzyme de dégradation l'IDE (Insulin Degrading Enzyme)[196].

L'obésité semble augmenter le risque de maladie d'Alzheimer de 50% [197].

L'hypercholestérolémie augmente la production du peptide amyloïde et notamment de ses formes les plus toxiques.

Le tabac provoque la production de radicaux libres qui entraînent un fort stress oxydatif ainsi qu'une inflammation provoquant des dommages cellulaires.

Les prédispositions génétiques. Une protéine a été mise en évidence, il s'agit de l'apolipoprotéine E (APOE). C'est un transporteur du cholestérol dont le rôle dans la maladie d'Alzheimer est encore débattu. Il semble toutefois participer à la clairance du peptide A β . En fonction de l'allèle porté le patient il a jusqu'à 3 fois plus de chance de déclarer la maladie. Il existe également de nombreux autres facteurs de susceptibilités découverts ces dernières années suite au séquençage du génome entier et aux études GWAS (Genome-Wide Association Study). Leurs rôles et implications sont encore mal connus dans le développement de la pathologie tout comme certains gènes controversés, c'est pourquoi il est difficile et quelque peu vain de tous les décrire ici. néanmoins, il existe une base de données régulièrement mise à jour qui répertorie l'ensemble des résultats : <http://www.alzgene.org/> [198].

B. Les formes familiales à début précoces

Dans 1% des cas de maladie d'Alzheimer, l'origine est purement génétique. Dans ce cas le début de la maladie peut être beaucoup plus précoce (dès 45 ans). Les mutations découvertes dans ces formes d'Alzheimer touchent la voie amyloïdogénique. Il s'agit de mutations sur le gène de la protéine β APP ainsi que de mutations sur les gènes des Présénilines 1 (PSEN1) et 2 (PSEN2). Toutes ces protéines participent à la production du peptide amyloïde, qui est le constituant majeur des plaques amyloïdes, un des marqueurs hystopathologiques de la maladie.

5. Les Causes de la maladie d'Alzheimer : hypothèse de la cascade amyloïde et clivage de la β APP

L'étiologie exacte de la maladie d'Alzheimer est encore aujourd'hui inconnue. Toutefois, il existe plusieurs hypothèses expliquant son origine. Au centre des recherches depuis plus de 20 ans, l'hypothèse la plus probable est celle de la cascade amyloïde [199, 200]. Cette hypothèse postule que c'est l'accumulation d'un composé toxique, le peptide β -amyloïde (A β), sous forme d'agrégats extracellulaires, les plaques séniles, est responsable de la mort cellulaire. Je décrirai donc ici le précurseur du peptide A β , ainsi que le clivage par la γ -sécrétase responsable de la formation de l'A β .

A. La β APP

La β APP est une protéine transmembranaire de type I, c'est-à-dire qu'elle ne présente qu'un seul segment transmembranaire. Son gène se trouve sur le chromosome 21 et il contient 19 exons. L'ARN messager de l'APP subit un épissage alternatif donnant naissance à 8 variants différents [201, 202]. Les trois formes majoritaires étant : la β APP695, la β APP751 et la β APP770. C'est une protéine ubiquiste mais qui est majoritairement exprimée au niveau du cerveau. L'expression est d'ailleurs variable en fonction du type cellulaire. Ainsi on retrouve majoritairement l'isoforme β APP695 au niveau des neurones, alors que les formes β APP751 et β APP770 sont présentes majoritairement au niveau des cellules gliales [203, 204].

Il existe deux protéines homologues à β APP ; il s'agit de APLP1 (β APP like protein 1) et APLP2 (β APP like protein 2). Ces protéines ne possèdent pas la même structure et ne donnent donc pas le même produit de clivage.

La β APP est une protéine transmembranaire constituée d'un domaine N-terminal extracellulaire long, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine C-terminal intracellulaire

court. Elle subit plusieurs modifications post-traductionnelles comme des O- et des N-glycosylations, des sulfanations et des phosphorylations [205]. Elle subit, de plus, une série de clivages qui va libérer différents peptides ayant chacun une activité propre que nous détaillerons plus tard.

La β APP possède cependant une fonction propre. Elle est capable de réguler la prolifération cellulaire et la croissance neuronale [206], ainsi que la répartition des neurones [207]. Cependant, de nombreuses fonctions sont assurées par les différents fragments de clivage obtenus.

A ce jour, plus de 40 mutations de la β APP ont été caractérisées dans la maladie d'Alzheimer : <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/>. Ces mutations modifient l'affinité pour les enzymes de clivage de la voie amyloïdogénique et ainsi augmentent la production d'A β et particulièrement les formes longues plus toxiques.

B. Les clivages de la β APP

La β APP subit une série de clivages qui vont conduire à la libération de plusieurs fragments protéolytiques. Il existe deux voies de clivage faisant intervenir deux enzymes à chaque fois. D'un côté, il existe une voie dite non amyloïdogénique, qui ne conduit pas à la formation du fragment A β et qui n'est pas pathologique. De l'autre, il existe une voie amyloïdogénique qui permet la formation de fragment A β et qui est celle favorisée en condition pathologique. Dans ce chapitre, je décrirai en détail uniquement la voie entraînant la formation du fragment amyloïdogénique (voir figure 9).

En condition physiologique la β APP subit un premier clivage en position 110-112 par l' α -sécrétase. L' α -sécrétase est une métalloprotéase de la famille des ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) [208]. C'est une protéine transmembranaire de la famille des protéases à zinc.

L'action de cette enzyme permet le clivage de la β APP libérant la partie N-Terminale en extracellulaire, c'est le sAPP α de 120kDa. La partie C-terminale reste ancrée à la membrane, c'est le C83 de 10kDa. Le C83 est alors coupé par une deuxième enzyme, la γ -sécrétase (que je décrirai plus loin) libérant ainsi un fragment soluble p3 extracellulaire et un fragment soluble intracellulaire l'AICD (APP IntraCellular Domain).

En condition pathologique, c'est un autre clivage qui est tout d'abord favorisé. Le clivage β -sécrétase intervient sur l'APP totale et libère un fragment extracellulaire de 110kDa le SAPP β et un fragment intramembranaire de 12kDa le C99. Le C99 est ensuite clivé par la γ -sécrétase, libérant ainsi l'A β extracellulaire de 4kDa, qui peut s'agréger et conduire à la formation des plaques séniles, et l'AICD en intracellulaire. Je vais maintenant décrire plus en détail la voie amyloïdogénique et plus particulièrement la coupure γ -sécrétase.

a. Le clivage β -sécrétase

L'activité β -sécrétase est portée par une protéine identifiée en 1999 par cinq équipes simultanément [209-213] et nommée BACE1 (β -site APP Cleaving enzyme 1). Le gène de BACE1 est porté sur le chromosome 11 et donne 4 ARNm différents dont trois subissent un épissage alternatif, produisant 4 isoformes différentes de la protéine dont la forme majoritaire est un peptide de 501 acides aminés.

C'est une protéase transmembranaire de type I de 70kDa de la famille des aspartyls protéases [214]. Elle présente un domaine catalytique possédant deux motifs DT/SGS/T acide aspartique très conservés au cours de l'évolution. Le site actif est orienté du côté extracellulaire

tout comme le site du clivage β sur l'APP. Elle est capable de cliver l'APP en deux endroits qui se situent en position 1 (site β) et 11 (site β') de l'A β . Ce clivage libère le sAPP β et le C99.

BACE 1 est exprimé dans tous les types cellulaires à un faible niveau et plus fortement au niveau du pancréas et des neurones. Cependant, l'isoforme principalement exprimé dans le pancréas clive peu la β APP.

BACE1 subit de nombreuses modifications post traductionnelles. Tout d'abord, elle est synthétisée sous la forme de zymogène où les pré- et pro-domaines sont clivés dans le réticulum endoplasmique et le réseau trans-golgien [215]. Elle subit également des acétylations/déacétylations, glycosylations, des palmitoylations et des phosphorylations dans ces mêmes compartiments. Ces modifications sont responsables de son activation et de son transfert à la membrane plasmique [216].

BACE1 est alors capable de cliver non seulement la β APP mais aussi d'autres substrats que je ne décrirai pas ici. Dans la pathologie, on note une augmentation de l'expression [217] et de l'activité de BACE1 [218]. Cela se traduit par un déséquilibre entre les clivages α et β au profit de la voie pathologique [212, 214]. De plus il y a diminution de la quantité de sAPP α .

b. Le clivage γ -sécrétase.

Le clivage γ -sécrétase est réalisé par un complexe multiprotéique. Il est composé de quatre protéines transmembranaires : les présénilines (1 et 2), la nicastrine (NCT), APH-1 (Anterior Pharynx defective-1) et PEN-2 (Preseniline ENhancer-2) [219-221]. Ces quatre membres doivent être présents avec une stœchiométrie de 1.1.1.1 pour que le complexe soit fonctionnel [221].

Il est responsable de la libération du fragment A β de sa contrepartie cytosolique l'AICD. L'activité protéique est portée par les PS1 et 2. Il détermine d'ailleurs la longueur du fragment A β puisque la coupure peut intervenir en position 40 ou 42, libérant deux types d'A β .

Ce complexe est extrêmement hydrophobe et se situe donc dans la membrane où se trouve le site de clivage γ . Cependant on retrouve ce complexe dans différents compartiments cellulaires et notamment dans le réticulum endoplasmique et dans le golgi, seul une petite partie de ce pool étant transporté à la membrane cellulaire [222, 223] et aussi dans les compartiments de recyclage endo/lysosome [223] [224].

La régulation de l'expression de cette sécrétase s'effectue tout d'abord par la création du complexe. APH-1 et la nicastrine initient l'assemblage. Une des PS se fixe ensuite à la nicastrine et PEN-2 enfin à la PS, ce qui l'active [225]. Il existe également une régulation fine de sa localisation intracellulaire et particulièrement son transport à la membrane, siège de son activité, mais ce mécanisme est encore mal connu [224]. D'autres protéines peuvent par la suite réguler le complexe comme TMP21 [226], CD147 [227], phospholipase D [227] et GSAP [225].

La γ -sécrétase est une enzyme qui clive plus de 90 substrats qui sont des protéines transmembranaires presque exclusivement de type I. Lister tous ces substrats ne présente pas un intérêt majeur pour ce travail mais une liste exhaustive a été publiée [228].

c. Les présénilines.

Les présénilines 1 et 2 sont les deux enzymes qui constituent le cœur catalytique du complexe γ -sécrétase [229, 230]. Les deux protéines sont codées par deux gènes présents sur les chromosomes 14 (PS1) et 1 (PS2). L'homologie de séquence entre ces deux protéines est de 67%. Elles sont tout d'abord traduites sous forme de précurseurs à 9 domaines transmembranaires [231]. Elles subissent ensuite un clivage endoprotéique aux extrémités C- et N-terminales ce qui libère deux fragments, qui restent tout de même liés l'un à l'autre [232]. Ce sont des résidus

aspartates présents sur ces deux fragments qui sont responsables de l'activité protéolytique. Les présénilines sont majoritairement retrouvées au niveau du cerveau avec une expression de PS1 supérieure à celle de PS2.

Les présénilines sont des membres du complexe γ -sécrétase, elles jouent donc un rôle dans le clivage de tous les peptides substrats de ce complexe. Cependant elles possèdent également plusieurs fonctions propres comme un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire [233], la signalisation calcique intercellulaire et plus particulièrement son rôle sur la neurotransmission glutaminergique [234, 235], le contrôle de l'excitation cellulaire et la potentialisation à long termes (LTP) [235] la différenciation cellulaire [236], la maturation synaptique et l'adhésion cellulaire [237-239] et enfin l'apoptose [240].

Dans la maladie d'Alzheimer plusieurs mutations ont été caractérisées sur les gènes des présénilines (voir <http://www.molgen.vib-ua.be/ADMutations/>). Le rôle exact de ces mutations est encore débattu mais il semble qu'elles entraînent une perte de précision du clivage de l'A β en faveur des formes plus longue A β 42 qui sont plus toxiques pour les cellules.

d. Le peptide A β .

Le peptide amyloïde ou A β est le composant majeur des plaques séniles. Le clivage qui conduit à la production de ce peptide a déjà été décrit et je ne reviendrai pas dessus. Il existe plusieurs sites de clivages possibles par la γ -sécrétase. Ainsi, l'A β peut être libéré sous forme longue (A β 49 ou 48) ou au contraire courte A β 40. En effet, à la suite d'un premier clivage, une série d'autres coupures peut rogner le peptide produisant d'autres espèces de tailles inférieures et aux propriétés différentes. Cependant ces clivages s'effectuent selon une séquence précise et seules certaines espèces peuvent être produites :

48 $\rightarrow$ 45 $\rightarrow$ 42 $\rightarrow$ 38 $\rightarrow$?

49 $\rightarrow$ 46 $\rightarrow$ 43 $\rightarrow$ 40 $\rightarrow$ 37

Plus les espèces sont courtes, et plus l'hydrophobicité diminue affectant ainsi son relargage dans le milieu extracellulaire [241].

A β possède plusieurs fonctions physiologiques. Il joue un rôle important dans le contrôle de la survie neuronale [242] lié à plusieurs stress et notamment à l'hyperexcitabilité membranaire [243, 244].

Dans la pathologie, le ratio entre A β 40 et 42 est modifié en faveur de la forme longue qui est la plus aggrégeant. Ce peptide s'accumule alors en extracellulaire, mais aussi d'après plusieurs études menées sur des modèles de souris, en intracellulaire. Cette accumulation est corrélée avec la perte synaptique [245]. Cependant notre laboratoire a récemment remis en cause cet état de fait en suggérant que c'est le fragment C99 qui s'accumule en premier [246]. Cette accumulation peut être due à une augmentation de la production via l'augmentation de l'activité β -sécrétase ou au contraire par une diminution de sa clairance. Il apparait que les deux voies sont touchées dans la pathologie. Enfin, le peptide amyloïde est connu pour augmenter l'expression de p53 [247] de Bax et diminuer celle de BCL-2 [248]. Ceci est corrélé avec un engagement des neurones sur la voie de l'apoptose [249].

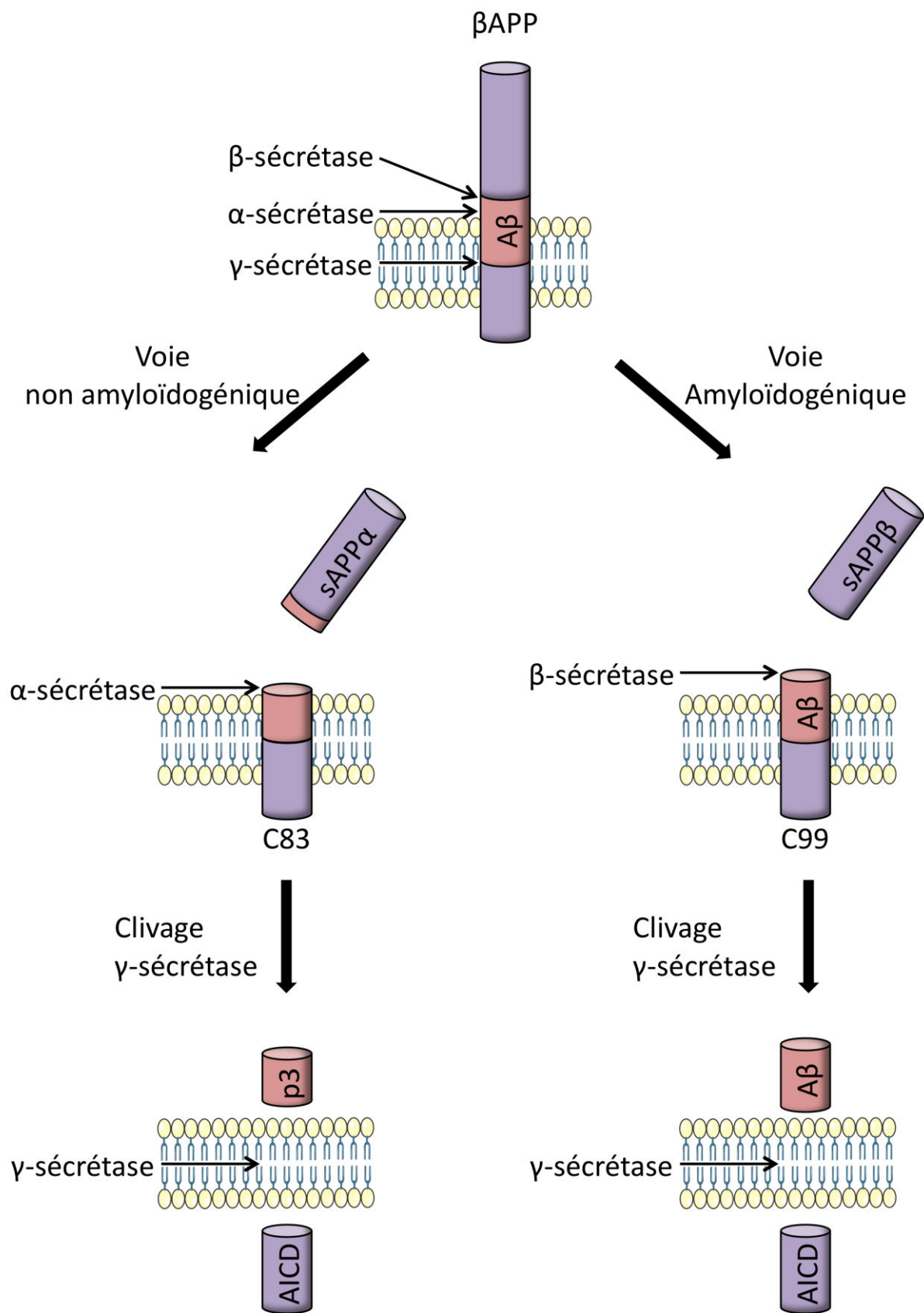


Figure 10: Les voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique de la β APP.

6. L'apoptose dans la maladie d'Alzheimer : un lien avec p53.

Contrairement à la maladie de Parkinson, le rôle de l'apoptose dans la maladie d'Alzheimer est encore aujourd'hui controversé, mais plusieurs éléments donnent du poids à cette hypothèse.

Des études réalisées sur des cerveaux de patients atteints par la maladie montrent que l'apoptose pourrait être impliquée [250]. Ces observations sont confirmées par des études histologiques qui mettent en évidence la fragmentation de l'ADN ainsi que la condensation puis la fragmentation nucléaire [251, 252].

Le clivage de la β APP jouant un rôle central dans la pathologie, l'effet de ces catabolites sur l'apoptose a été étudié. Il apparaît que plusieurs d'entre eux semblent contrôler la mort cellulaire programmée. Tout d'abord, une surexpression d'A β 42 est co-localisée avec des neurones en apoptose [253]. L'agrégation de ce catabolite est d'ailleurs corrélée avec une augmentation de l'expression de l'ARNm des caspase-3, 7 et 8 [254]. Un autre fragment C-terminal (CT105) est connu pour affecter la survie des astrocytes [255]. Le C31 produit une toxicité dans une lignée de neurones de souris (TSM1) via une voie indépendante de la caspase-3 [256]. Ce fragment est issu du clivage de la β APP par la caspase-3 et s'accumule dans les cerveaux de patients [257]. Enfin, la toxicité de l'A β est également vérifiée dans des modèles de souris Alzheimer (mutant préséniline 1). L'accumulation d'A β y induit une dégénérescence rétinienne [258].

Comme décrit dans le chapitre consacré à l'apoptose, p53 est un acteur clé de ce mécanisme via ces propriétés de facteur transcription ou indépendamment de celles-ci. Son expression est d'ailleurs très altérée dans la pathologie. L'expression de p53 est augmentée dans les neurones [259-261] et dans les cellules gliales de cerveaux de malades [262]. Cette augmentation d'expression est à mettre en relation avec les marqueurs histologiques d'apoptose retrouvés dans ces mêmes cellules [260].

Pour comprendre l'origine de cette accumulation de p53, l'effet des fragments d'APP sur cette protéine a donc largement été étudié. Tout d'abord; il apparaît que l'expression de p53 est augmentée par l'A β 42 [247]. Cette accumulation des deux composés étant retrouvée dans les neurones ayant une morphologie atypique dans des modèles de souris ou dans des cerveaux de patients. La contrepartie intracellulaire de l'A β , l'AICD peut agir comme facteur de transcription [263] et contrôle l'expression de p53 au niveau transcriptionnel [264]. L'effet exact de se contrôle de catabolites d'APP sur p53 est encore discuté mais l'hypothèse la plus solide est le redémarrage du cycle cellulaire qui tout comme dans la maladie de Parkinson conduit à une apoptose cellulaire[265].

Enfin, p53 peut contrôler l'expression de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Tout d'abord, il apparaît que sur les cinq protéines qui peuvent entrer dans la composition du complexe γ -sécrétase, trois sont régulées par p53. Il s'agit de Pen-2 et des préséniline 1 et 2, qui en retour régulent p53. Les deux derniers membres du complexe quant à eux inhibent p53 (voir figure 10) [266]. Les PS1 et PS2 ont en retour un effet sur p53. PS1 inhibe p53 alors que p53 l'active. Ces données sont à mettre en parallèle aux effets des mutations des PS. Une inactivation ou une déplétion de PS1 entraîne une augmentation de l'apoptose alors que PS entraîne au contraire un phénotype pro-apoptotique.

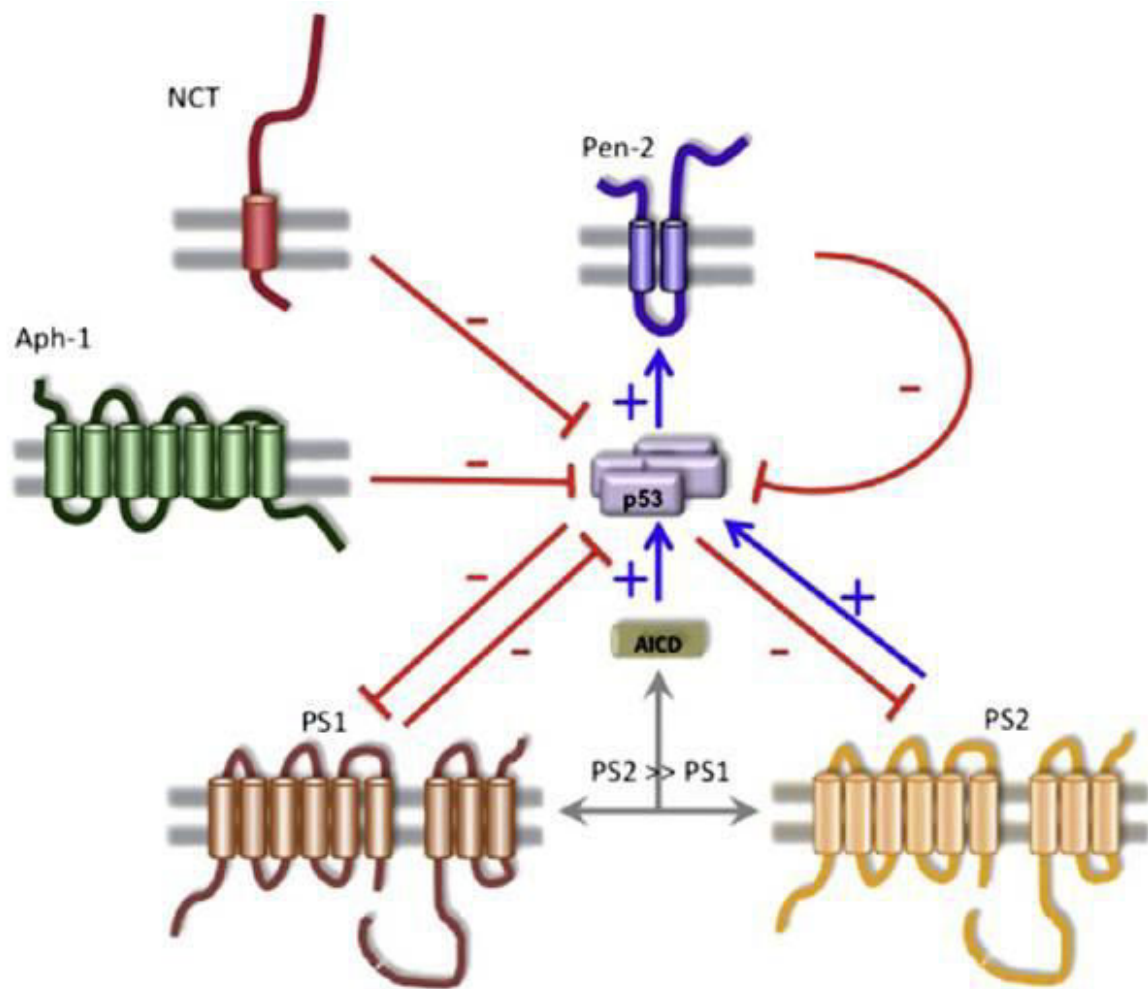


Figure 11: Dialogue moléculaire entre p53 et les membres du complexe γ-sécrétase (d'après Checler et al., 2014)

III. Les gliomes

Les cancers sont des maladies prolifératives caractérisées par une physiopathologie commune. En effet, bien que la cause puisse être différente, quel que soit le tissu concerné, les cellules partagent des dérèglements communs. Elles perdent leur programmation normale et cessent de répondre aux stimuli environnementaux. Il en résulte une croissance et une prolifération anormale couplées à une absence d'apoptose. Les cellules perdent leur liaison au reste du tissu et finissent par migrer vers un autre tissu.

Ainsi si nous nous focalisons sur les tumeurs cérébrales on distingue trois cas possibles.

Les tumeurs primitives : le premier organe touché est le cerveau. Le type cellulaire impliqué est donc issu du tissu cérébral. On peut donc grossièrement séparer ces tumeurs entre les gliomes qui touchent la glie, les neuroblastomes qui proviennent de neurones et les méningiomes qui proviennent des méninges.

Les Tumeurs secondaires : elles proviennent d'un autre cancer dont elles sont issues par métastases. Elle présente alors les caractéristiques histologiques du tissu d'origine (poumon, sein, côlon ou mélanome malin en général).

Les lymphomes (produits à partir des organes lymphatiques).

Dans cette étude, je me concentrerai principalement sur les gliomes.

1. Définition et généralités

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales de l'adulte les plus fréquentes, dont l'étiologie reste encore largement inconnue. Elles touchent les cellules de soutien du système nerveux : les cellules de la glie. Ces cellules sont de différents types, les cancers provenant de chaque type étant différents. Ce sont des tumeurs rares, mais extrêmement invalidantes dont le pronostic est variable. Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitements efficaces pour la majorité de ces cancers, ce qui rend leurs issues souvent fatales et qui fait peser un poids socio-économique important sur notre société.

2. Epidémiologie

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales de l'adulte les plus fréquentes, mais elles restent cependant rares. En effet elles touchent environ 5 cas pour 100000 habitants. Mais représente près de 60% des cas de tumeurs cérébrales. Ce sont des pathologies qui touchent principalement le sujet âgé avec un pic de fréquence vers 60 ans. Il existe cependant certaines formes que je décrirai plus tard qui touchent uniquement les enfants.

3. Causes

L'étiologie des gliomes est aujourd'hui encore mal connue. Cependant, environ 5% des cas sont d'origine familiale. Pour les 95% restant plusieurs facteurs de risques sont décrits. L'âge

semble être déterminant puisque la fréquence augmente avec celui-ci. De nombreux facteurs environnementaux ont été décrits. Certains composés chimiques sont suspectés d'être cancérigènes et d'induire des tumeurs du cerveau comme le chlorure de vinyle, ou encore le virus d'Epstein-Barr. Plusieurs études pointent le rôle des rayonnements ionisants dans le développement des gliomes et notamment l'utilisation de téléphone portable. Il apparaît que si ces rayonnements peuvent entraîner l'apparition d'un cancer, c'est à des intensités auxquelles nous ne sommes pas soumis dans la vie de tous les jours [267].

4. Aspects cliniques

Chercher à définir une symptomatologie précise est impossible pour les gliomes. En effet, contrairement aux autres pathologies traitées dans ce manuscrit, ils ne touchent pas une zone précise du cerveau. Or, l'encéphale est un organe complexe, aux multiples fonctions siégeant dans des zones très différentes. Ainsi, en fonction de la localisation de la tumeur, les symptômes pourront être très différents, mais sa croissance se traduira par des déficits neurologiques. Par exemple, nous pouvons citer des troubles de la vision (tumeur occipitale), des troubles de l'audition (tumeur temporale) ou même des sauts d'humeurs voire un changement de comportement (tumeur frontale). Si la tumeur siège près du cortex, des crises d'épilepsies peuvent être observées. Cependant, les céphalées sont un symptôme commun très courant. Elles sont souvent liées à l'hypertension intracrânienne provoquée par la croissance tumorale. Elle se manifeste par des maux de tête violents du côté de la tumeur et des vomissements.

Devant la multitude de symptômes possibles, le diagnostic est souvent complexe. Face à l'ensemble des signaux neurologiques le clinicien va réaliser des clichés de l'encéphale. Un scanner cérébral permet de détecter la tumeur. En effet, la zone étant le siège d'une intense prolifération cellulaire elle apparaît plus dense à l'imagerie. La sensibilité est de l'ordre de 90%. L'utilisation d'une IRM permet de mieux définir la topologie de la tumeur et offre une sensibilité de 100%. La confirmation du diagnostic et plus précisément la classification de la tumeur se fait après un examen histologique suite à une biopsie.

La distinction classique entre tumeur bénigne et tumeur maligne est ici peu employée. En effet, au vu de l'organe touché, même les tumeurs de bon pronostic sont considérées comme graves et potentiellement mortelles. De plus, bien que ce soit possible, il y a peu de métastases à partir des gliomes.

5. Classification

Les gliomes sont classés en fonction de critères histopathologiques précis selon une échelle qui rend compte des différences observées, de la sévérité de la maladie, du pronostic et de l'évolution possible. Historiquement, il existe plusieurs classifications des glioblastomes. Ici nous ne traiterons que les deux principales et les plus utilisées aujourd'hui. La classification de l'hôpital Sainte Anne et la classification de l'OMS.

Ces deux classifications se basent en premier lieu sur les caractéristiques histologiques de la tumeur : quel est le type cellulaire d'origine, oligodendrogliome ou astrocytome. Puis, elles subdivisent ces groupes en fonction des altérations cancéreuses observées.

A. Classification de l'hôpital Sainte Anne

Cette classification résulte pour l'essentiel, de l'étude de biopsies étagées stéréotaxiques corrélées à l'imagerie [268]. Elle s'intéresse à la structure spatiale des gliomes et à leur mode de croissance. Elle intègre, également des données cliniques, de l'imagerie à l'histologie traditionnelle.

Il existe selon cette classification quatre classes de gliomes [269, 270] :

- Les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A
- Les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B
- Les glioblastomes
- Les tumeurs glioneurales malignes.

L'évaluation du degré de malignité des gliomes repose sur deux critères :

- L'hyperplasie des cellules endothéliales
- La prise de contraste à l'imagerie

Les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A sont caractérisés par l'absence d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste, alors que les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B comportent une hyperplasie endothéliale et/ou une prise de contraste.

Les glioblastomes présentent une forte nécrose et une vascularisation importante du tissu avec de nombreuses cellules mitotiques.

B. La classification de l'OMS

Elle est issue de l'étude anatomo-pathologique du tissu après biopsie [271]. Dans cette classification il a été établi un premier niveau de classement selon l'origine histologique de la tumeur : cellules oligodendrogiales ou astrocytes ou un mélange des deux (oligoastrocytome). Ensuite l'étude des caractéristiques secondaires d'anaplasie pour définir le grade de la tumeur (anaplasie, hyper-cellularité, hyperplasie, polymorphisme cellulaire, atypies nucléaires, activité mitotique atypiques).

Cette classification se décompose en quatre grades : I, II, III, IV

a. Les astrocytomes.

L'astrocytome pilocytique (tumeur de grade I) s'observe typiquement chez l'enfant et l'adulte jeune. Ce sont des tumeurs très différentes des autres, de bon pronostic et aisément traitable par chirurgie. Je n'en parlerai pas ici.

L'astrocytome diffus de grade II est défini par une cellularité augmentée, par des atypies cytonucléaires et par la présence d'une mitose au maximum. Il n'y a pas de nécrose ni de prolifération microvasculaire. Elles touchent principalement l'adulte jeune avec un pic de fréquence entre 30 et 40 ans. La survie avec traitement est de 6 à 8 ans et elles peuvent parfois évoluer en glioblastomes en 4 à 5 ans.

L'astrocytome anaplasique de grade III présente une densité cellulaire nettement plus importante, des atypies nucléaires marquées et des mitoses. Il est de plus mauvais pronostic que l'astrocytome de grade II et présente un pic de fréquence autour de 45 ans. La survie après traitement est de 2 à 3 ans et le risque d'évolution vers le grade IV après 2 ans est très important.

L'astrocytome de grade IV ou glioblastome (GBM) présente une forte nécrose d'origine ischémique, les plages nécrotiques étant délimitées par des palissades cellulaires. Il y a une forte activité angiogénique avec la présence de nombreux gros vaisseaux souvent thrombosés avec infiltration de microvaisseaux. Bien que seul les astrocytes puissent atteindre le grade IV, on peut retrouver des zones oligodendrogliales. On parlera alors de glioblastomes mixtes. Ce sont des tumeurs très infiltrantes dont les berges sont mal définies ce qui rend la résection chirurgicale complexe et peu efficace. Ces tumeurs ont le plus mauvais pronostic avec une survie sans traitement de 6 mois et qui reste inférieure à un an avec traitement. Elles touchent à tout âge avec un pic de fréquence entre 45 et 75 ans.

b. Les oligodendrogliomes.

Les oligodendrogliomes de grade II sont des tumeurs de faible densité présentant quelques atypies nucléaires et de rares mitoses. Ce sont des tumeurs de bon pronostic avec un taux de survie à 10 ans après traitement d'environ 50%, mais peuvent récidiver. Elles touchent l'adulte avec un pic de fréquence entre 35 et 45 ans.

Les oligodendrogliomes anaplasique de grade III présentent de grandes variations au niveau de la morphologie des cellules. La microvascularisation est présente et il peut y avoir nécrose tissulaire mais rien de comparable aux glioblastomes. Le pronostic est plus mauvais avec une survie après traitement de 2 à 3 ans et des risques de récives. La fréquence est la même que celle du grade II

c. Les oligoastrocytomes.

Bien souvent les tumeurs présentent les deux origines histologiques. On parlera alors de gliomes mixtes ou oligoastrocytomes. Ce terme regroupe les tumeurs qui présentent des populations astrocytaires et oligodendrogliales séparées (et ce quels que soit les degrés de différenciation) ou bien lorsque les cellules ont une morphologie hybride.

6. Voies de signalisations dérégulées dans les gliomes.

L'apparition et le développement de tumeurs sont des événements complexes qui font intervenir de nombreux processus cellulaires et moléculaires. Ce mécanisme, appelé la transformation requiert l'inactivation de plusieurs fonctions cellulaires. La dérégulation de ces fonctions constitue des marqueurs de tumorigénèse [272]. Il s'agit de :

- Maintenir un signal de prolifération.
- Ne plus répondre aux inhibiteurs de croissance.
- Etre capable d'envahir le tissu adjacent et produire des métastases.
- Etre capable d'une immortalité réplivative.
- Induire l'angiogénèse.
- Résister à la mort cellulaire.

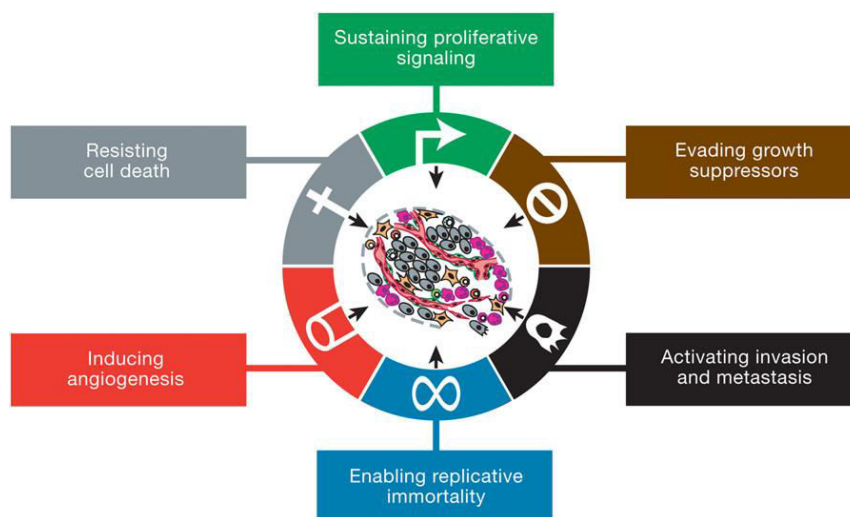


Figure 12: Mécanismes affectés lors de la transformation cellulaire dans les cancers (d'après Hanahan et al., 2009)

Il existe à l'heure actuelle deux hypothèses oncogénétiques majeures expliquant le développement des gliomes :

Les cellules tumorales proviennent de la différenciation de cellules matures. Ces cellules via les modifications des mécanismes décrits ci-dessus acquerraient la capacité à se diviser et à proliférer très rapidement donnant naissance à une tumeur. Cette hypothèse bien que séduisante ne permet pas d'expliquer l'existence de tumeurs mixtes.

Il y a différenciation de cellules progénitrices pluri- ou multipotentes qui vont proliférer et se transformer en cellules tumorales différenciées [273, 274]. Cette hypothèse présente l'avantage d'expliquer l'existence de tumeurs formées à partir de différents types histologiques et elle est à l'heure actuelle privilégiée.

A. p53

p53 est probablement une des protéines clés pour comprendre l'étiologie des gliomes. C'est une protéine que l'on retrouve mutée dans la majeure partie des cancers surtout ceux du système central. De nombreuses mutations ont été découvertes et peuvent être consultées sur la base de donnée en ligne IARC : <http://p53.iarc.fr/> [275]. Les plus courantes dans les gliomes sont les mutants 175, 248 et 273, qui siègent dans les régions liées à la fixation de l'ADN.

La proportion de mutation est variable en fonction du type de gliomes. Elle est élevée dans les GBM (70%), les astrocytomes (50%) et les gliomes mixtes (40%) et plus faible dans les oligodendrogliomes purs [271, 276-278]. Il existe une controverse au sujet de la fréquence de mutations entre glioblastomes primaires et secondaires. Pendant longtemps, l'hypothèse prédominante a été que les mutations étaient plus fréquentes chez les gliomes secondaires que chez les gliomes primaires, mais une étude récente semble indiquer qu'il n'en est rien [279, 280]. Cependant la localisation des mutations sur le gène semble être fonction du type de tumeur. Ainsi dans les glioblastomes secondaires les mutations siègent principalement sur deux codons clés, les 248 et 273 alors que dans les primaires la distribution est plus aléatoire [281].

Plusieurs études ont mis en évidence un lien entre mutation de p53 et accumulation de la protéine. Cette accumulation est due à la présence de mutations qui l'empêche de contrôler sa propre dégradation. Cependant, le processus est plus complexe, puisque ces mutations possèdent

un caractère dominant négatif. Elles s'agrègent avec le p53 sauvage et le séquestrent dans le cytosol empêchant son transfert au noyau [282-284].

De plus, p53 est dégradée sous le contrôle de MDM2 que l'on retrouve amplifiée dans près de 10 % des glioblastomes (mais pas ceux où p53 est mutée) ce qui conduit ici aussi à son inactivation et sa dégradation par le protéasome [285]. De manières similaires à MDM2, les altérations de MDM4 conduisent à une inactivation de p53 [286, 287].

ARF est un activateur de p53. Il se fixe à MDM2 et bloque son activité ce qui provoque une levée d'inhibition sur p53 [288, 289]. Une inactivation ou des mutations sont fréquemment retrouvées dans les gliomes [290]. Cette mutation d'un effecteur clé de la régulation de p53 constitue un autre élément important dans le développement des tumeurs.

Comme décrit précédemment p53 est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la prolifération mais également de la mort cellulaire. Ainsi pour contrer le développement de tumeurs, p53 bloque le cycle cellulaire de manière à régler les problèmes. Si ce n'est pas possible, la cellule est alors orientée vers la voie de l'apoptose. On comprend alors aisément l'effet délétère que revêtent tous ces processus qui ont en commun de modifier son expression ou son activité.

B. La voie pRB.

La protéine pRB (protéine de Rétinoblastome) est une protéine de séquestration qui exerce un contrôle négatif du cycle cellulaire. En pratique, elle bloque le cycle cellulaire en phase G1 en se liant et en inhibant les facteurs de transcription de la famille E2F. En condition physiologique, elle est inactivée par le complexe cyclineD1/CDK4/CDK6. Les kinases phosphorylent pRB qui relâche E2F, permettant ainsi la progression de la phase G1 vers la phase S.

La portion chromosomique où se situe le gène de la pRB est connue pour être impliquée dans le développement des astrocytomes [291]. Des mutations sont d'ailleurs retrouvées sur ce gène dans près de 20% des gliomes. Dans les gliomes sont retrouvés également des mutations sur le gène de CDKN2B, un inhibiteur des CDK. Il en résulte que pRB est constamment inactivé ce qui accélère la prolifération cellulaire. Les mutations qui l'inactivent conduisant aux mêmes effets.

C. La voie PI3K-PTEN-Akt-mTOR

Cette voie de signalisation est impliquée en condition physiologique dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Elle contrôle plusieurs processus comme l'apoptose, la croissance, le contrôle du cycle cellulaire, l'angiogenèse ou encore le métabolisme cellulaire. L'altération de l'ensemble de ces processus constitue des étapes clés dans la transformation en cellules tumorales. On comprend alors pourquoi c'est une voie qui est très altérée dans les cancers et notamment dans les gliomes [292-294]. En effet, la plupart des protéines qui la compose sont soit des suppresseurs de tumeurs soit des proto-oncogènes. Cette voie de signalisation est très complexe et possède de multiples embranchements que je ne décrirai pas tous ici (pour revue, voir [295]).

Au niveau membranaire sont présents différents récepteurs à activité tyrosine kinase qui peuvent être activés par différents ligands (facteur de croissance : IDGF, EGF, PDGF et des cytokines : IL 1, 2, 4, 6...). Lors de la fixation, il y a dimérisation du récepteur qui va alors pouvoir phosphoryler un premier messenger, le PI3K. C'est un hétérodimère à activité kinase constitué de deux protéines : une sous-unité régulatrice p85, et une sous-unité catalytique p110. Ce composé peut être inhibé par l'action de PTEN, une phosphatase. PI3K va alors transformer

le PIP2 (phosphatidylinositol-diphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-triphosphate). Ce composé recrute la kinase AKT qui est activé par PDK1. AKT présente de nombreuses cibles en aval dont mTOR (mamalian Target Of Rapamycin). Cette dernière protéine est une kinase qui joue un rôle dans de nombreux processus. Cette voie est altérée dans près de 70% des gliomes.

Nous retrouvons souvent des amplifications des récepteurs dans les cas de cancers comme par exemple l'EGFR, du VEGFR ou PDGFR α [296]. L'EGFR est particulièrement altéré dans les glioblastomes et son amplification, que l'on retrouve dans près de 35% des cas, conduit à l'activation constitutive de cette voie [297, 298]. Ce récepteur est également retrouvé muté, dans 40% des cas. La délétion sur les exons 2-7 conduit à la formation d'un mutant constitutivement actif [299].

PTEN (Phosphatase and tensin homologue located on chromosome TEN) est un suppresseur de tumeur fréquemment retrouvé muté dans les glioblastomes. C'est un inhibiteur de cette voie. Les délétions ou les mutations présentent dans les tumeurs conduisent à une levée d'inhibition [300].

Enfin, des études ont montré que l'effecteur final de la voie mTOR est impliqué dans le développement des tumeurs [293]. Pour être active cette protéine doit être présente au sein d'un complexe protéique. Deux sont connus : le complexe 1 (mTORC1) ou mTOR interagit avec RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of mTOR) et le complexe 2 (mTORC2) ou elle interagit avec RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR). Chaque complexe a un effet différent. Le complexe 1 inhibe l'autophagie, active HIF1 α (Hypoxia Induce Factor 1 α) ce qui induit une angiogenèse, et active la prise lipidique. mTORC2 active la capture de glucose et la prolifération cellulaire ainsi que des voies de survie. En ce sens, ils jouent un rôle d'oncogène puisque leurs activations constitutives régulent à la hausse des mécanismes clés de la transformation.

7. La parkine

Bien qu'historiquement caractérisé dans la maladie de Parkinson, la parkine semble jouer un rôle dans le développement des cancers. A l'heure actuelle, peu d'éléments lient directement la parkine aux gliomes. Il existe cependant de nombreux éléments l'impliquant dans d'autres types de cancer.

A. Rôle de la parkine dans les tumeurs périphérique

Tout d'abord, l'utilisation de nouvelles approches de séquençage à haut débit a permis de mettre en évidence que le gène PARK 2 semble être muté dans un certain nombre de cancers [301, 302]. Cependant le rôle de ces mutations est encore à définir.

De plus, il existe des pertes de copies du gène de la parkine dans de nombreux cancers différents comme les tumeurs de l'ovaire et du sein [303], du rein [304] et du poumon [305, 306]. Là encore l'effet exact de ces délétions n'est pas bien connu.

Le gène de la parkine est soumis à l'hyperméthylation dans de nombreux types de cancers [307, 308]. C'est un mécanisme épigénétique commun pour diminuer l'expression d'un gène qui est souvent observé dans les tumeurs. C'est le cas dans la leucémie myéloïde [307] chronique ainsi que dans les tumeurs colorectales [308].

Enfin, une expression anormale de l'ARNm ou de la protéine est également observée dans différentes tumeurs. L'expression de l'ARNm est diminuée dans les cas de cancer du sein,

de l'ovaire, du pancréas, du rein, du colon, du poumon et dans les leucémies [301-303, 305, 306, 309]. En parallèle aux ARNm, l'expression de la protéine est aussi retrouvée diminuer dans plusieurs types de tumeurs : tumeurs du foie et de l'ovaire [309, 310], et les cancers du sein [96, 311], du rein [312] et du pancréas [93].

En plus de sa modulation, on note que la parkine est impliquée dans plusieurs processus cellulaires dérégulés dans les cancers.

L'organisation du cytosquelette microtubulaire est un élément important de différenciation cellulaire. La perte ou la désorganisation de ce réseau est fréquemment observé dans les phénomènes d'invasion et dans l'apparition de métastase [313, 314]. Comme décrit dans le chapitre 1, la parkine joue un rôle dans la dynamique du réseau. Son inactivation pourrait donc être favorable au développement de métastase.

La parkine est également impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire comme vu précédemment. Elle est une des gardiennes du bon déroulement de la mitose. Le dérèglement du cycle est un élément clé de la transformation cellulaire. Dans les cancers, la perte de la régulation liée à la parkine pourrait être un facteur favorisant l'aneuploïdie.

Les cellules cancéreuses sont soumises à un important stress énergétique. C'est pourquoi elles passent d'un métabolisme respiratoire mitochondrial à une glycolyse aérobie. Ce changement est connu comme l'effet Warburg est nécessaire et caractéristique au développement des tumeurs [272]. Une étude de 2011 a montré que la parkine est capable, via son dialogue fonctionnel avec p53, de réguler le métabolisme cellulaire [315]. La réduction du taux de parkine active la glycolyse et inhibe la respiration mitochondriale ce qui caractérise l'effet Warburg.

La parkine semble également capable de moduler l'endocytose et le trafic intracellulaire de l'EGFR via la protéine Eps15 [316]. En interagissant avec ces deux protéines, la parkine les ubiquitine toutes les deux, action stimulée par la fixation de l'EGF sur son récepteur. Ceci gêne l'interaction d'Eps15 avec EGFR empêchant son internalisation, stimulant ainsi la voie AKT et donc la survie cellulaire. Au contraire, en absence de parkine, on observe une dégradation accrue de l'EGFR et donc une inhibition de la voie EGF/AKT. Ceci est paradoxal dans la mesure où une diminution d'expression de la parkine dans les cancers s'accompagnait d'une inhibition de la survie cellulaire, ce qui n'est pas le cas. Cette étude ayant été réalisée dans des cellules COS-7 et HEK 293, suggère un mécanisme tissu spécifique. D'ailleurs une étude réalisée dans les gliomes indique un effet opposé sur la voie AKT [118].

Le rôle de la parkine dans l'apoptose est connu [103, 116]. Cependant ce rôle est surtout établi dans les neurones mais les résultats dans le cancer sont plus discutés. Il semble néanmoins que la parkine joue un rôle anti-apoptotique et sensibilise les tumeurs à certains stimuli [317].

B. Rôle de la parkine dans les tumeurs du système nerveux central : Le cas des gliomes

Il convient maintenant de s'intéresser plus spécifiquement au rôle de la parkine dans les gliomes. En effet, bien que les résultats précédemment décrits soient consistants, il existe tout de même quelques différences en fonction du type cellulaire, et peu d'études se sont concentrées sur le rôle de la parkine dans le développement des gliomes.

En 2011, une équipe a mis en évidence l'existence d'une série de mutations somatiques de la parkine dans des échantillons de gliomes humains [318]. Ces mutations, bien que différentes, touchent les mêmes zones et parfois les mêmes résidus que ceux caractérisés dans la maladie de Parkinson, mais sont pourtant complètement nouveaux. Ces mutations ont pour effet d'abolir

le rôle antiprolifératif de la parkine et pourraient ainsi rendre compte du rôle de la parkine dans la pathologie.

En 2012, une autre équipe a mis en évidence que la parkine est capable de moduler l'expression de la cycline D1, mais pas l'expression de la cycline E dans des cellules de gliomes où le taux de parkine est très bas [118]. La restauration du taux de parkine résulte en un arrêt des cellules en phase G1 et un ralentissement de la prolifération gliomale. Ceci s'accompagnant d'une diminution de la phosphorylation d'AKT et de l'expression du récepteur au VEGF. Cette étude ouvre ainsi la voie à la compréhension du rôle suppresseur de tumeur de la parkine dans les gliomes.

IV. Lien entre les pathologies

Tout au long de cette introduction, je me suis efforcé de décrire les maladies de Parkinson, d'Alzheimer et les gliomes. Historiquement ces trois pathologies furent étudiées séparément, et il est vrai que chacune dispose de mécanismes propres, comme par exemple les causes, les protéines impliquées et l'origine des formes génétiques. Cependant, il apparaît également derrière cette façade que de nombreux processus physiopathologiques sont communs à ces maladies. C'est de ce constat qu'est née l'idée de ce projet; et je vais ici présenter les points communs qui appuient cette hypothèse.

1. Lien entre maladie de Parkinson et maladie d'Alzheimer

Le premier point commun entre les pathologies de Parkinson et d'Alzheimer réside évidemment dans leur nature même. En effet, se sont toutes deux des maladies neurodégénératives. Cela veut dire que dans les deux cas, il existe une mort des neurones dont nous ne connaissons pas la cause. L'origine de cette mort est encore mal connue mais on observe tout de même des similitudes au niveau de l'origine.

Dans les deux cas, il y a une accumulation anormale de protéines, Corps de Lewy d'un côté (en majorité de l' α -synucléine) et de l'autre, plaques séniles (peptide A β) et dégénérescences neurofibrillaires (protéine Tau). Bien que les composants ne soient pas identiques, il en découle une série de réactions qui sont assez similaires : toxicité cellulaire, inhibition du protéasome.

De plus, et bien que ce soit encore un peu débattu dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, il y a une apoptose présente dans les deux pathologies, avec comme effecteur commun, la protéine p53. Ce facteur de transcription est non seulement un effecteur clé de l'apoptose, mais présente comme décrit précédemment, la capacité à réguler les protéines caractéristiques de ces deux pathologies. La présence d'un tel effecteur commun est un élément fort qui lie les deux maladies.

Enfin, après avoir mis en évidence que la parkine régule p53 au niveau transcriptionnel, nous avons cherché la séquence consensus du promoteur. Par étude de promoteur, nous avons identifié une séquence de fixation que nous avons retrouvée sur le promoteur des présénilin1 et 2. Ceci a constitué la première partie de mon travail, et je décrirai ces résultats plus loin.

2. Liens entre maladie de Parkinson et les gliomes.

L'existence d'un lien entre ces deux pathologies, peut sembler surprenant au premier abord. En effet, d'un côté nous avons une maladie proliférative, de l'autre une maladie dégénérative. Cependant, il existe des études épidémiologiques qui pointent l'existence d'une corrélation négative entre maladie de Parkinson et cancer [319, 320]. En analysant finement la physiopathologie de ces deux maladies il apparaît que c'est le contrôle de la mort et de la survie des cellules qui sont déréglés. En effet dans la maladie de Parkinson on assiste à un excès d'apoptose alors qu'à l'inverse dans le cancer il y a une inhibition très forte de l'apoptose avec sur-activation des voies de survie. C'est donc le même ensemble de processus qui est touché mais de manière diamétralement opposé. Devant ce lien, nous avons émis l'hypothèse de l'existence de

dénominateurs communs à ces deux pathologies. Dans le but de valider cette hypothèse, nous avons décidé d'étudier le rôle des protéines caractérisées dans la maladie de Parkinson mais dans les cancers. Le choix des gliomes vient du lieu où siège la maladie de Parkinson. C'est une pathologie cérébrale et les protéines que nous avons choisies comme cible, bien qu'ubiquistes sont majoritairement exprimées au niveau du cerveau. Notre choix a d'ailleurs été confirmé rapidement par la découverte en 2010 de mutations de la parkine spécifiques aux gliomes.

Enfin, les deux pathologies présentant une altération de l'apoptose, p53 joue un rôle dans les deux maladies. Il est impliqué aussi bien dans la survie et l'apoptose que dans le contrôle de l'expression des protéines caractéristiques de la maladie de Parkinson.

V. Objectifs

Durant les quatre années de mon doctorat, mon travail s'est articulé autour de l'étude de la fonction de la parkine dans l'étiologie des maladies neurodégénératives et des cancers cérébraux. Plus particulièrement je me suis intéressé au nouveau rôle de facteur de transcription de la parkine dans ces pathologies, notre équipe ayant montrée qu'elle est capable de réprimer transcriptionnellement p53. P53 est une protéine clé de la réponse au stress oxydatif ou réticulaire et de la mort cellulaire. Cette régulation est donc un élément fort ; liant la parkine à ces trois phénomènes. Nous avons donc étudié la parkine selon deux axes spécifiques :

Le premier axe de ma thèse a été d'étudier plus en détail **la nouvelle fonction de la parkine**. Cette approche purement mécanistique était nécessaire pour envisager sereinement l'étude de nouvelles cibles de la parkine. Ce premier point a donc servi de base à mon projet.

Le deuxième axe s'est inscrit dans **une perspective plus fonctionnelle**. J'ai étudié le rôle de la parkine dans le contrôle des mécanismes de stress et d'apoptose au travers du dialogue fonctionnel qu'elle entretient avec p53. En effet, comme montré dans l'introduction, le contrôle des différents stress et de la mort cellulaire constitue un élément clé de la physiopathologie des maladies neurodégénératives et des cancers.

Ce travail a donné lieu à trois publications.

Dans la première publication, nous avons étudié la fonction transcriptionnelle de la parkine sur les présénilines 1 et 2. Il s'agit de protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer.

Dans la seconde publication nous avons étudié le contrôle exercé par la parkine sur DJ-1 en condition de stress réticulaire.

Dans la troisième publication j'ai étudié contrôle de p53 sur la parkine et plus particulièrement l'effet de ce contrôle dans les gliomes.

VI. Résultats

Mon travail de thèse a donné lieu à trois publications dans des revues à comité de lecture que je vais vous présenter maintenant.

Les trois articles sont présentés dans ce manuscrit par ordre chronologique (le premier étant le premier soumis). Ce choix peut sembler paradoxal dans la mesure où le troisième article et celui sur lequel je suis premier auteur ; mais il résulte de la volonté de faire apparaître ce travail dans sa continuité. En effet, cet ordre permet de présenter les publications de la plus « fondamentale » vers la plus « appliquée ». De plus, cet ordre rend compte du cheminement de pensées qui guide le laboratoire et qui a guidé ma thèse. Nous avons tout d'abord étudié la fonction transcriptionnelle de la parkine et avons cherché à compléter l'étude de 2009 de Cristine Alves da Costa. Le premier article nous a permis de mieux comprendre la fixation de la parkine à l'ADN. Puis nous avons étudié le rôle de la parkine dans la maladie de parkinson sous un nouvel angle. Dans le second article nous avons montré que la parkine contrôle DJ-1 dans le contexte du stress réticulaire. Enfin, dans le troisième article, mon approche a été quelque peu différente puisque j'ai mis en évidence le rétrocontrôle de p53 sur la parkine et l'implication de cette boucle dans le cadre de l'étiologie des gliomes. Ce projet sort donc du périmètre connu de la parkine dans les maladies neurodégénératives pour s'intéresser à une pathologie où son rôle est moins décrit, les gliomes. L'ensemble de ce travail est très intéressant mais sert également de base à d'autres projets que j'ai initiés mais dont l'avancée est trop faible pour être présentée ici.

Article 1

Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription

Eric Duplan, Jean Sevalle, **Julien Viotti**, Thomas Goiran, Charlotte Bauer, Paul Renbaum, Ephrat Levy-Lahad, Clément A. Gautier, Olga Corti, Nathalie Leroudier, Frédéric Checler et Cristine Alves da Costa

Article

Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription

Eric Duplan^{1,†}, Jean Sevalle^{1,†}, Julien Viotti¹, Thomas Goiran¹, Charlotte Bauer¹, Paul Renbaum², Ephrat Levy-Lahad², Clément A. Gautier³, Olga Corti³, Nathalie Leroudier¹, Frédéric Checler^{1,*,†}, and Cristine Alves da Costa^{1,*,†}

¹ Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275 CNRS/UNSA, Team 'Fondation pour la Recherche Médicale' and 'Labex Distalz', 660 route des Lucioles, Sophia-Antipolis, Valbonne 06560, France

² Medical Genetics Institute, Shaare Zedec Medical Center, Hebrew University Medical School, Jerusalem, Israel

³ INSERM U679, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France

[†] These authors contributed equally to this work.

* Correspondence to: Cristine Alves da Costa, E-mail: acosta@ipmc.cnrs.fr; Frédéric Checler, E-mail: checler@ipmc.cnrs.fr

We previously established that besides its canonical function as E3-ubiquitin ligase, parkin also behaves as a transcriptional repressor of p53. Here we show that parkin differently modulates presenilin-1 and presenilin-2 expression and functions at transcriptional level. Thus, parkin enhances/reduces the protein expression, promoter activity and mRNA levels of presenilin-1 and presenilin-2, respectively, in cells and *in vivo*. This parkin-associated function is independent of its ubiquitin-ligase activity and remains unrelated to its capacity to repress p53. Accordingly, physical interaction of endogenous or overexpressed parkin with presenilins promoters is demonstrated by chromatin immunoprecipitation assays (ChIP). Furthermore, we identify a consensus sequence, the deletion of which abolishes parkin-dependent modulation of presenilins-1/2 and p53 promoter activities. Interestingly, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) revealed a physical interaction between this consensus sequence and wild-type but not mutated parkin. Finally, we demonstrate that the RING1-IBR-RING2 domain of parkin harbors parkin's potential to modulate presenilins promoters. This transcriptional control impacts on presenilins-associated phenotypes, since parkin increases presenilin-1-associated γ -secretase activity and reduces presenilin-2-linked caspase-3 activation. Overall, our data delineate a promoter responsive element targeted by parkin that drives differential regulation of presenilin-1 and presenilin-2 transcription with functional consequences for γ -secretase activity and cell death.

Keywords: parkin, presenilins, transcription, γ -secretase activity, apoptosis

Introduction

Parkin is a pleiotropic protein responsible for most of autosomal recessive juvenile forms of Parkinson's disease (PD) (Dawson and Dawson, 2010; Corti et al., 2011). This protein was first reported to behave as an ubiquitin ligase (Shimura et al., 2000), and therefore, to be involved in proteasome-mediated elimination of various substrates. To date, about two dozens of parkin substrates have been identified and it has been postulated that the control of their lifetimes underlies several dysfunctions taking place in PD, since most of parkin-associated mutations abolish its ubiquitin-ligase activity (Shimura et al., 2000). However, besides this canonical function, several studies have indicated that additional parkin-dependent

cellular pathways could exist. Thus, we recently documented the fact that parkin could act, in an ubiquitin-ligase independent manner, as a direct transcriptional repressor of the tumor suppressor p53 promoter activity (da Costa et al., 2009).

We and others have documented the fact that p53 could regulate the expression and functions of presenilin-1 (PS1) and presenilin-2 (PS2) (Roperch et al., 1998; Pastorcic and Das, 2000; Checler et al., 2010), two proteins responsible for most of the familial cases of Alzheimer's disease (AD) (Checler, 1999) that are mainly involved in the production of the amyloid β peptide (A β) and in caspase-3-mediated cell death (De Strooper et al., 1998; Wolfe, 2001; Alves da Costa et al., 2002, 2006). Interestingly, recent data also indicate that parkin could control the homeostasis of intracellular A β 42 (Burns et al., 2009; Rosen et al., 2010). These observations underlie the present study that aimed at examining whether parkin could control PS1 and/or PS2 and their related functions, and if so, whether

it was via a possible direct transcriptional control of PS promoters or indirectly, via p53.

Our data strikingly show that parkin indeed acts as a direct transcriptional activator of PS1 and as a direct transcriptional repressor of PS2. Accordingly, this is accompanied by enhanced γ -secretase activity and lower caspase-3 activation. We establish that parkin-mediated control of PS promoters is independent of its ubiquitin-ligase activity and unrelated to its ability to modulate p53. Of most importance, in support of our description of a novel transcription factor activity, we have delineated a conserved sequence on human PS1, PS2, and p53 promoters that could have served as parkin-targeted consensus sequence. Indeed, we document a direct physical interaction of parkin with this sequence, the deletion or mutation of which abolishes the ability of parkin to modulate the above-cited promoter activities. Our data indicate for the first time that PS1 and PS2 promoters could be controlled differently at transcriptional level and in an opposite manner and thereby identify another potential pathway to selectively interfere with PS1-mediated γ -secretase activity and PS2-associated cell death. Furthermore, the delineation of a parkin-targeted responsive element on presenilins and p53 promoters opens a new avenue to the identification of additional and yet unknown parkin transcriptional targets. This should avoid deleterious effects linked to pharmacological approaches that aim at interfering with parkin-mediated ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of other proteins often involved in vital cellular functions.

Results

Overexpressed and endogenous parkin control presenilins transcription

Figure 1A–F shows that the stable overexpression of parkin in TSM1 neurons increases PS1 protein expression ($+72\% \pm 12.3\%$, $n = 8$, $P < 0.001$, Figure 1A), promoter activity ($+48.4\% \pm 6.4\%$, $n = 8$, $P < 0.001$, Figure 1B), and mRNA levels ($+108.5\% \pm 25.4\%$, $n = 4$, $P < 0.01$, Figure 1C), and decreases PS2 expression ($-30.1\% \pm 19.7\%$, $n = 6$, $P < 0.05$, Figure 1D), promoter activity ($-42.6\% \pm 12.4\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, Figure 1E), and mRNA levels ($-52\% \pm 20.9\%$, $n = 6$, $P < 0.05$, Figure 1F). Interestingly, the above data were fully confirmed in non-transformed primary cultured neurons where parkin transfection leads to increased PS1 expression (Supplementary Figure S1A), promoter transactivation (Supplementary Figure S1B), and mRNA levels (Supplementary Figure S1C). Conversely, parkin overexpression reduces PS2 expression (Supplementary Figure S1D), promoter activity (Supplementary Figure S1E), and mRNA levels (Supplementary Figure S1F). The above overexpression data were corroborated by the examination of the ability of endogenous parkin to modulate PS1 and PS2 in immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEF). Thus, parkin depletion decreases PS1 expression ($-56.0\% \pm 4.1\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, Figure 1G, see NPS1 in left panel and grey bars), promoter activity ($-45.2\% \pm 8.7\%$, $n = 8$, $P < 0.001$, Figure 1H, upper panel), and mRNA levels ($-79.8\% \pm 8.7\%$, $n = 4$, $P < 0.01$, Figure 1I, gray bars), while parkin deficiency increases PS2 protein levels ($+184.8\% \pm 38.4\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, Figure 1G, see CPS2 in left panel and black bars), promoter activity ($+590.8\% \pm 72.5\%$, $n = 8$,

$P < 0.001$, Figure 1H, lower panel), and mRNA levels ($+118.8\% \pm 20\%$, $n = 8$, $P < 0.01$, Figure 1I, black bars). These data were reinforced by our demonstration that the depletion of parkin in mouse brain reduces PS1 expression ($-65.2\% \pm 22\%$, $n = 4$, $P < 0.05$, Figure 1J, see NPS1 in left panel and gray bars) and mRNA levels ($-45.2\% \pm 8.7\%$, $n = 8$, $P < 0.05$, Figure 1K, gray bars) and enhances PS2 expression ($+77.3\% \pm 23.7\%$, $n = 4$, $P < 0.05$, Figure 1J, see CPS2 in left panel and black bars) and mRNAs levels ($+89.6\% \pm 43.6\%$, $n = 6$, $P < 0.05$, Figure 1K, black bars).

Impact of parkin on presenilin-1 and 2-associated functions

We have examined whether parkin-mediated modulation of PS1 and PS2 could induce functional consequences. In order to directly assess the influence of parkin on PS1-associated γ -secretase, we used an *in vitro* assay with reconstituted membranes that allows monitoring productions of A β and its C-terminal counterpart β APP intracellular domain (AICD) (Pardossi-Piquard and Checler, 2011) from an exogenous recombinant substrate (C100, see Supplementary Figure S3, box Figure 2, panels A–F), thereby reflecting the activity/levels of γ -secretase only (Sevalle et al., 2009). Figure 2A and B shows that the overexpression of parkin in TSM1 neurons (see parkin expression in Figure 1A) increases A β ($+59\% \pm 14\%$, $n = 9$, $P < 0.001$, Figure 2A) and AICD ($+25\% \pm 4\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, Figure 2B) productions, while *parkin* gene depletion in immortalized fibroblasts (see parkin expression in Figure 1G) decreases both A β ($-63\% \pm 5.5\%$, $n = 9$, $P < 0.001$, Figure 2C) and AICD ($-92\% \pm 14\%$, $n = 6$, $P < 0.001$, Figure 2D). In order to avoid any artifactual effect due to parkin depletion engineering or immortalization process, we confirmed this data in another cell system corresponding to primary MEFs (provided by Dr J. Shen) in which parkin had been deleted (see parkin expression in Supplementary Figure S3, box Figure 2). Indeed, we confirmed that endogenous parkin depletion triggered decreases of both A β ($-64.2\% \pm 3.8\%$, $n = 9$, $P < 0.001$, Figure 2E) and AICD ($-46.5\% \pm 3.8\%$, $n = 9$, $P < 0.001$, Figure 2F) productions. Finally, in order to examine whether parkin-linked modulation of PS could impact on their cell death associated functions, we analyzed the influence of parkin on thapsigargin (TPS)-induced reticular stress conditions by monitoring caspase-3 activity. Three lines of independent data indicate that this paradigm can be indeed considered a read out of PS function. First, both parkin and PS (see PS expressions in HEK293 and MEF in Supplementary Figure S3, box Figure 3, panels C, E and panel D, respectively) interfere with TPS-induced caspase-3 activation. Thus, the overexpression of parkin (Figure 3A, compare black and white + bars) or PS1 (Figure 3C, compare black and white bars labeled +) reduces TPS-stimulated caspase-3 activity, while PS2 increases this activity (Figure 3C, compare black and grey bars labeled +). Second, conversely, the depletion of parkin (Figure 3B, compare black and white bars labeled +) or PS1 (Figure 3D, compare black and white bars labeled +) increases TPS-induced caspase-3 activation, while PS2 deficiency reduces this activity (Figure 3D, compare black and light grey bars labeled +). Interestingly, the depletion of both PS1 and PS2 mimics the phenotype observed with PS2 depletion only (Figure 3D, compare black and dark grey bars labeled +),

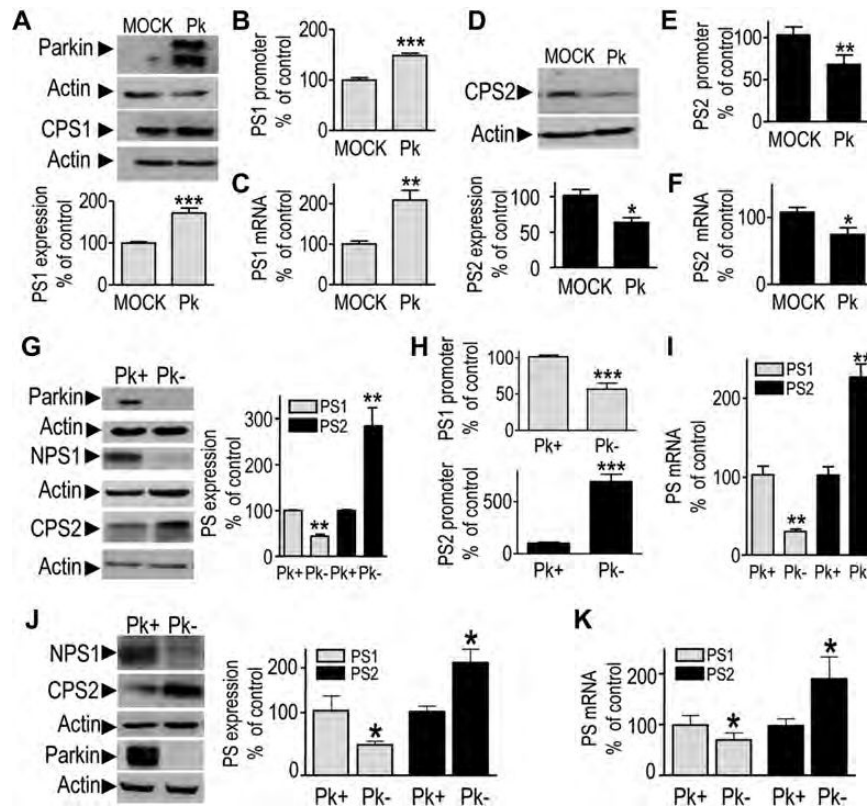


Figure 1 Parkin controls presenilins expression, promoter activity, and mRNA levels *ex vivo* and in mouse brains. (A–F) TSM1 neurons were stably transfected with pcDNA3 (Mock) or human parkin cDNA (Pk) and then PS1 and PS2 expression (A and D), promoter activity (B and E), and mRNA levels (C and F) were analyzed as described in Methods. The bars represent the means $\pm$ SEM of 3–4 independent experiments performed in duplicate and are expressed as percent of control mock-transfected cells. Actin was used as protein and mRNA loading control, while β -galactosidase measurement was used to normalize luciferase-based promoter assays as described in Methods. (G–I) Wild-type (Pk+) or *parkin* null (Pk–) immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEF) were analyzed for PS1 and PS2 expressions (G), promoter activities (H), and mRNA levels (I) as described in Methods. The bars represent the means $\pm$ SEM of 3 or 4 independent experiments performed in duplicate and are expressed as percent of control wild-type fibroblasts. (J and K) PS1 and PS2 protein (J) and mRNA (K) levels normalized in function of actin protein and mRNA levels were determined in homogenates derived from wild-type (Pk+) and knockout (Pk–) mouse brains. The bars represent the means $\pm$ SEM of 4–8 brains. Expressions of proteins appearing in panels A, G, and J were measured and visualized as described in Methods.

indicating, in agreement with our previous study (Alves da Costa et al., 2002, 2006), that PS2 is dominant over PS1 for the control of ER-stress-associated cell death. Third, we observed that transient expression of HA-parkin (see expression in Supplementary Figure S3, box Figure 3, panel E) reverses PS2-associated enhancement of TPS-induced caspase-3 activation ($-51.4\% \pm 18.9\%$, $n = 6$, $P < 0.001$, Figure 3E, compare EV and Pk grey bars), while it does not affect PS1-protective activity (Figure 3E, compare EV and Pk white bars). The above set of data clearly indicates that parkin-mediated control of PS1 and PS2 has functional consequences for both PS1-associated γ -secretase activity and PS2-linked modulation of caspase-3 activity.

Parkin-mediated control of PS1 and PS2 is independent of its ubiquitin-ligase activity

In order to assess whether parkin-mediated control of PS1 and PS2 required its ubiquitin-ligase activity, we transiently transfected various parkin cDNA-bearing mutations that either abolish [C418R (418), C441R (441)] or preserve [K161N (161), R256C (256)] parkin E3-ligase activity in dopaminergic SH-SY5Y

neuroblastoma cells (da Costa et al., 2009). We first confirmed that transient overexpression of wild-type parkin (Figure 4A) upregulates PS1 expression ($+42.1\% \pm 4.5\%$, $n = 7$, $P < 0.05$, Figure 4B), mRNA levels ($+151.9\% \pm 8.5\%$, $n = 6$, $P < 0.001$, Figure 4C), and PS1 promoter activity ($+112\% \pm 28\%$, $n = 8$, $P < 0.01$, Figure 4E), and decreases PS2 expression ($+26.1\% \pm 7.1\%$, $n = 10$, $P < 0.05$, Figure 4B), mRNA levels ($-67.6\% \pm 16.6\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, Figure 4D), and promoter activity ($-57.1\% \pm 13.1\%$, $n = 8$, $P < 0.01$, Figure 4F). Interestingly, all mutations abolish parkin-associated effects on PS1 and PS2 proteins and mRNA levels and promoter activities (Figure 4A–F). This set of data was reinforced by rescue experiments in which *parkin* null fibroblasts were transiently transfected with either wild-type or mutated parkin cDNA. As expected, wild-type parkin increases or decreases PS1 or PS2 promoter activity, respectively, while mutant parkin constructs were totally inactive (Figure 4G and H). It is important to note that, in agreement with the above-described data, the same parkin mutations fully abolish caspase-3 activation and p53 repression in transiently

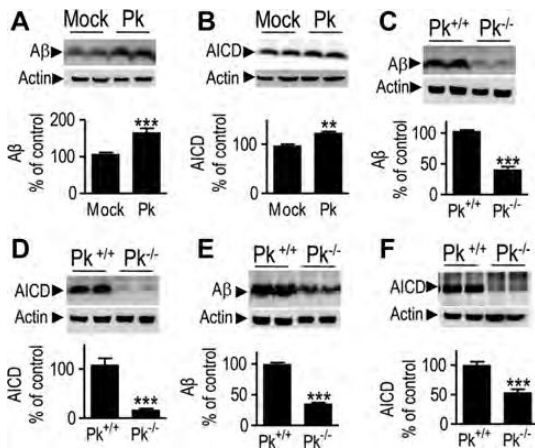


Figure 2 Parkin regulates PS-dependent γ -secretase activity. (A–F) *In vitro* γ -secretase-mediated production of A β (A, C, and E) and AICD (B, D, and F) by reconstituted membranes prepared from TSM1 neurons stably overexpressing parkin (A and B), immortalized (C and D) or primary (E and F) MEFs invalidated for the *parkin* gene were measured as described in Methods. Each panel contains a representative gel and a histogram in which bars correspond to the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in duplicate (B and D) and triplicate (A, C, E, and F). The absence of parkin in immortalized MEFs is illustrated in Figure 1G and the lack of parkin in primary MEFs is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 2, panels E, F). The expression of recombinant substrate C100 is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 2, panels A–F).

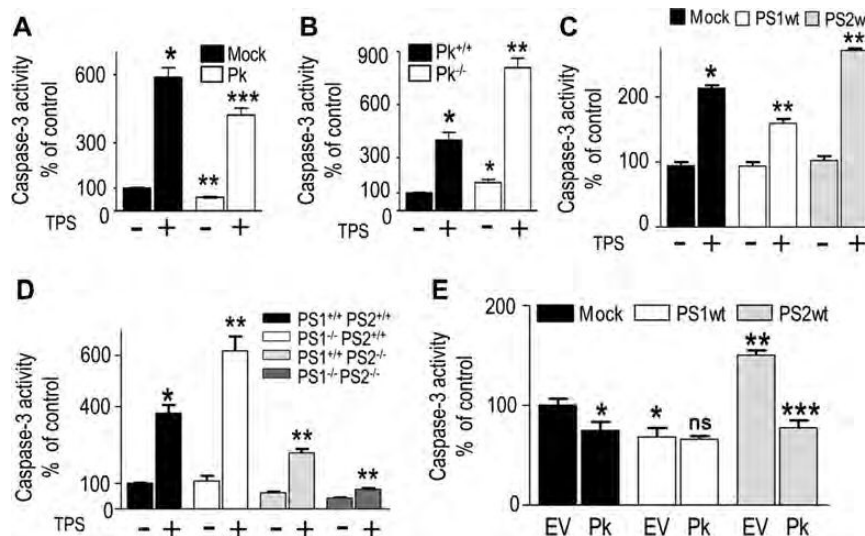


Figure 3 Parkin regulates presenilin-mediated control of cell death. (A–D) Determination of caspase-3 activity as described in Methods in TSM1 neurons stably overexpressing either an empty vector (Mock) or wild-type parkin (Pk) (A), in MEF cells invalidated (Pk^{-/-}) or not (Pk^{+/+}) for the *parkin* gene (B), in HEK293 overexpressing an empty vector (Mock), wild-type PS1 (PS1wt), or wild-type PS2 (PS2wt) (C), and in wild-type MEF cells (PS1^{+/+} PS2^{+/+}) or MEF invalidated for the *PSEN1* (PS1^{-/-} PS2^{+/+}), *PSEN2* (PS1^{+/+} PS2^{-/-}), or for both *PSEN1* and *PSEN2* (PS1^{-/-} PS2^{-/-}) genes (D). Cells were treated for 15 h with vehicle (DMSO, –) or with TPS (1 μ M, +). The bars correspond to the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. (E) HEK293 overexpressing either PS1 or PS2 was transiently transfected with a control empty vector (EV) or wild-type parkin (Pk) cDNA and analyzed for caspase-3 activity at 24 h after transfection as described in Methods. The bars express the percentage of control EV-transfected mock cells and are the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Expression of PS1 and PS2 in HEK293 cells used in C and E is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 3, panels C, E). PS expression in cells invalidated for one or both PS appearing in D is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 3, panel D). Expression of wild-type HA-parkin in E is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 3, panel E).

transfected SH-SY5Y cells and fibroblasts and unlike wild-type parkin, failed to rescue the defect of parkin-associated function observed in *parkin null* fibroblasts (da Costa et al., 2009). Overall, these data demonstrate that parkin-associated control of PS1 and PS2 is not cell specific and is not artifactually related to cell transformation or engineering and, more importantly, that this function remains independent of its ubiquitin-ligase activity.

Parkin-mediated control of PS1 and PS2 involves neither p53 nor PS1 and PS2 interplay

We have examined whether parkin-associated control of PS transcription could be mediated by the tumor suppressor p53. This hypothesis was based on several considerations. First, several studies documented the ability of p53 to repress PS1 promoter transactivation (Pastorc and Das, 2000) and expression (Roperch et al., 1998). Second, our previous study indicated that parkin transcriptionally represses p53 (da Costa et al., 2009). Third, the present data show that parkin increases PS1 expression and promoter transactivation (see Figure 1A, B, G and H). Fourth, both parkin-mediated regulation of p53 and PS1 remain independent of its ubiquitin-ligase activity (see Figure 4A and B). It was, therefore, conceivable that parkin could indirectly activate PS1 transcription via p53 repression. This hypothesis was examined by comparing parkin cDNA transient transfection (parkin expression is shown in Supplementary Figure S3, box Figure 5, panels A, C and panels B, D) in two cellular models in which the *p19^{Arf-1}* gene alone or in combination with

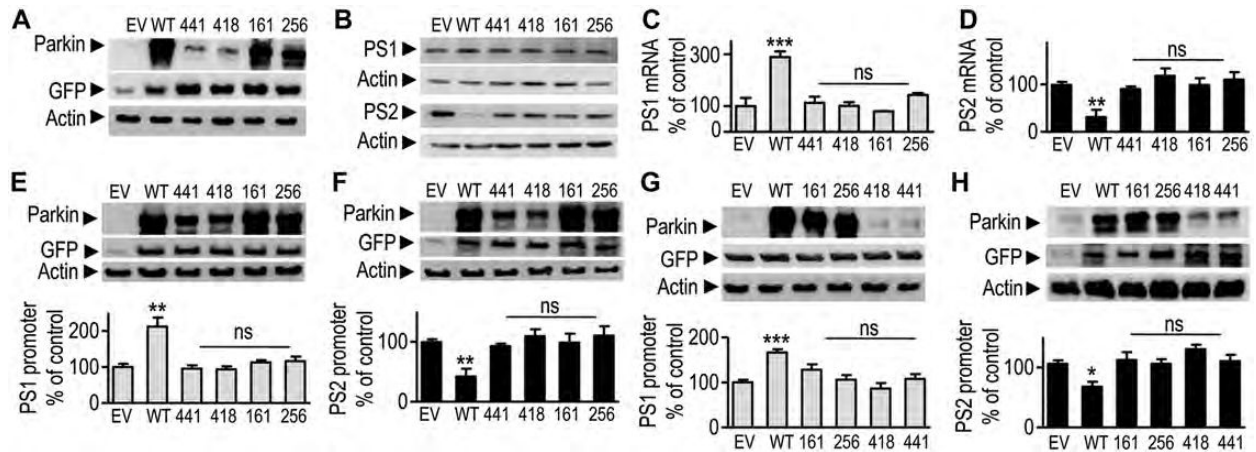


Figure 4 Parkin control presenilins independent of its ubiquitin-ligase activity. (A–D) SH-SY5Y human neuroblastoma cells were transiently transfected with the indicated cDNAs (EV: empty pIRES2-EGFP vector, Pk: wild-type parkin, 441: C441R Pk mutation, 418: C418R Pk mutation, 161: K161N Pk mutation, and 256: R256C Pk mutation) alone (A–D) or in conjunction with a mix of PS1 (E) or PS2 (F) promoter/ β -galactosidase constructs. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested and examined for human PS1 protein (B) and mRNA (C) expressions or promoter activation (E) or PS2 protein (F) and mRNA (D) expressions or promoter activation (F) as described in Methods. Expression of parkin in A reflects its expression levels in experiments presented in B–D. We measured GFP expression in order to assess that similar transfection efficiencies were achieved. Note that parkin variation in expression is thus to be accounted for variable metabolic stability as already documented by da Costa et al. (2009) and not due to variable transfection efficiencies. The bars are expressed as percent of control EV-transfected cells and represent the means $\pm$ SEM of 3–4 independent experiments performed in duplicate. (G and H) *Parkin* null fibroblasts were transiently transfected with the indicated wild-type or mutated parkin cDNA in combination with a mix of PS1 (G) or PS2 (H) promoter/ β -galactosidase constructs and then luciferase activity was measured as described in Methods. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

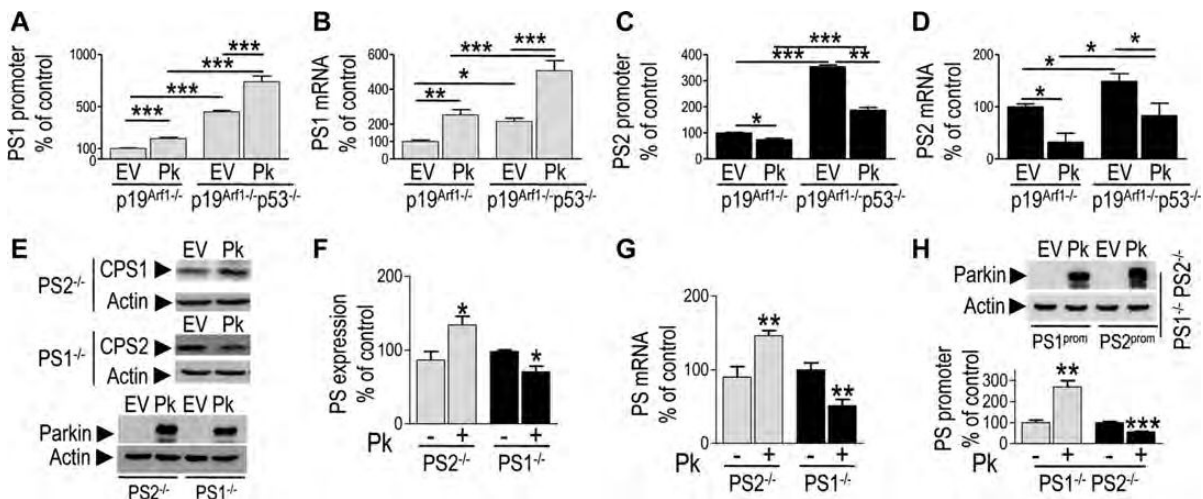


Figure 5 Parkin-mediated control of presenilins is independent of p53 and is not affected by PS1 and PS2 functional interplay. (A–D) *p19^{Arf}*^{−/−} and *p19^{Arf}*^{−/−} *p53*^{−/−} fibroblasts were transiently transfected with an empty vector (EV) or with wild-type parkin (PK) cDNAs with (A and C) or without (B and D) corresponding PS-luciferase promoter construct. Twenty-four hours after transfection the cells were examined for PS1 (A) and PS2 (C) promoter activities and PS1 (B) and PS2 (D) mRNA levels as described in Methods. The bars are expressed as percent of control EV-transfected *p19^{Arf}*^{−/−} cells and are the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in duplicate or triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns, not statistically significant. (E–G) MEF invalidated for either *PSEN2* (*PS2*^{−/−}) or *PSEN1* (*PS1*^{−/−}) genes were transiently transfected with a control empty vector (EV, −) or wild-type parkin (Pk, +) and then analyzed for their endogenous PS1 (grey bars) and PS2 (black bars) protein expressions (E and F) and mRNA levels (G) as described in Methods. The bars represent the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (H) MEF cells invalidated for both *PSEN2* and *PSEN1* genes (*PS1*^{−/−} *PS2*^{−/−}) were transiently co-transfected with a control empty vector (EV, −) or wild-type parkin (+) together with PS1 (grey bars) or PS2 (black bars) promoter/ β -galactosidase cDNA constructs and analyzed for their luciferase activities as described in Methods. The bars represent the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in duplicate. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. The characterization of *p53* null cells used in A–D is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 5, panels A–D). Parkin expression in promoter (A and C) or mRNA (B and D) analyses are shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 5, middle and lower panels).

the *p53* gene *p19^{Arf-1}p53^{-/-}* (see *p53* expression in Supplementary Figure S3, box Figure 5, panels A–D) had been invalidated (Kamijo et al., 1997). First, we confirm that the absence of endogenous *p53* increases PS1 promoter activity and mRNA levels (compare EV bars in *p19^{Arf-1}p53^{-/-}* and *p19^{Arf-1}p53^{-/-}* in Figure 5A and B). In *p19^{Arf-1}p53^{-/-}*, parkin clearly increases PS1 promoter activity and mRNA levels (Figure 5A and B, compare EV and Pk bars) and reduces PS2 transcription and mRNA levels (Figure 5C and D, compare EV and Pk bars). Interestingly, parkin still increases PS1 promoter transactivation ($+63.8\% \pm 13.7\%$, $n = 9$, $P < 0.001$, Figure 5A) and mRNA levels ($+135.8\% \pm 23\%$, $n = 6$, $P < 0.001$, Figure 5B) in *p19^{Arf-1}p53^{-/-}* fibroblasts, while parkin-mediated reduction of PS2 promoter activity ($-52.9\% \pm 11.5\%$, $n = 9$, $P < 0.01$, Figure 5C) and mRNA levels ($-55.7\% \pm 25.7\%$, $n = 6$, $P < 0.05$, Figure 5D) still occurs in *p53*-depleted fibroblasts. This set of data allowed us to conclude that parkin-mediated control of PS transactivation remains independent of *p53*.

The regulation of PS1 and PS2 by parkin could have been complicated by the intimate cross-talk between PS1 and PS2. Thus, we and others (Alves da Costa et al., 2002, 2006; Kang et al., 2005) demonstrated that PS1 could control the expression of PS2 and *vice versa* as confirmed in Figure 5E (compare CPS1 and CPS2 expressions in PS2^{-/-} and PS1^{-/-} cells, respectively). This led us to compare the ability of parkin to control the transcription of PS1 or PS2 in cells lacking its congener (see PS expressions in Supplementary Figure S3, box Figure 3, panel D). Clearly, parkin overexpression (Figure 5E, bottom panel) still upregulates endogenous PS1 expression ($+47.6\% \pm 16.4\%$, $n = 6$, $P < 0.05$, compare grey bars in Figure 5F) and mRNA levels ($+56.2\% \pm 15.8\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, compare grey bars in Figure 5G) in PS2^{-/-} cells, while it decreases endogenous PS2 protein ($-27.5\% \pm 7.7$, $n = 6$, $P < 0.05$, compare black bars in Figure 5F) and mRNA ($-51.1\% \pm 8.2\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, compare black bars in Figure 5G) levels in PS1^{-/-} fibroblasts. Furthermore, transient co-transfection of PS1 or PS2 promoters with parkin cDNA (see parkin expression in Figure 5H, upper panel) still increases PS1 promoter activity ($+169.4\% \pm 32.1\%$, $n = 6$, $P < 0.01$, Figure 5H, grey bars) and reduces PS2 promoter activity ($-44.3\% \pm 5.3\%$, $n = 6$, $P < 0.001$, Figure 5H, black bars) in fibroblasts lacking both PS1 and PS2. The overall set of data indicates that the protective phenotype of parkin could indeed be mediated by a *p53*-independent control of PS1 and PS2, and does not involve PS1/PS2 functional interplay.

PS1 and PS2 are parkin transcriptional targets

Since parkin-mediated control of PS transactivation was unrelated to its ubiquitin ligase activity and independent of *p53*, this led us to envision PS1 and PS2 as putative new parkin transcriptional targets. We have delineated the promoter region where parkin could have bound to PS promoters. The deletion of a $-297/-11$ nucleotide-long fragment in the 5' region of the PS1 promoter abolishes parkin-mediated promoter activation (compare constructs 1 and 2 in Figure 6A), while the removal of the $+353/+590$ region of PS2 promoter fully abolishes the inhibitory effect of parkin on PS2 promoter transactivation (compare constructs 7 and 8 in Figure 6B). Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) performed with specific primers covering

the promoter regions identified above demonstrate the physical interaction of parkin with PS promoters. Thus, the immunoprecipitation of parkin yields specific amplification products with both PS1 and PS2 primers that are drastically enhanced in parkin overexpression conditions (compare IP lanes in Pk and EV conditions in Figure 6C). Of most importance, ChIP analyses indicate that the PCR product of IPed material obtained with PS1 and PS2 primers in wild-type fibroblasts was not amplified in *parkin null* fibroblasts (Figure 6D). Altogether, this indicates that both endogenous and overexpressed parkin physically interact with PS1 and PS2 promoters.

Identification of a parkin consensus binding sequence

By means of an *in silico* approach, we have identified a common GCCGGAG heptamer motif in PS1, PS2, and *p53* promoter sequences (Figure 7A). Interestingly, this putative consensus sequence was exactly located in the identified regions involved in parkin-induced promoter modulations (see Figure 6A and B and da Costa et al., 2009) and in the PS1, PS2, and *p53* PCR products of amplification detected in ChIP experiments described in Figure 6C and D and in da Costa et al. (2009). In order to validate the functionality of this consensus sequence, we have deleted it from PS1, PS2, and *p53* full-length promoter sequences. Of most interest, the ablation of this sequence in *p53* (Figure 7B), PS1 (Figure 7C), and PS2 (Figure 7D) completely abolishes parkin-mediated transcriptional regulation of these promoters (Figure 7B–D) (see parkin expression in Supplementary Figure S3, box Figure 7, panels B–D).

In order to substantiate the validity of this consensus sequence, we have produced recombinant wild-type and mutated parkin (see parkin expressions in Supplementary Figure S3, box Figure 7, panels E–I) and examined their ability to bind biotinylated probes corresponding to PS1 and PS2 sequences encompassing this consensus domain. Wild-type recombinant parkin interacts with both PS1 and PS2 probes (Figure 7E and F). This labeling was fully abolished by excess of specific probe (lanes s in Figure 7E and F) but was not competed by an excess of unspecific probe (lanes ns in Figure 7E and F). Interestingly, recombinant mutant parkins were unable to interact with both PS1 and PS2 sequences (Figure 7E and F). Finally, the interaction of recombinant parkin with PS1, PS2, and *p53* probes in which the consensus sequence had been mutated was drastically reduced, though not fully abolished (Figure 7G–I, compare ct and ct mut lanes). Overall, these data clearly identify a putative consensus parkin-binding sequence that likely underlies its transcriptional activity. *Parkin controls PS promoter modulation via its RING1-IBR-RING2 domain*

We have previously established that parkin physically interacts with *p53* via its RING1 domain (da Costa et al., 2009). We, therefore, assessed the contribution of the RING1-IBR-RING2 domain of parkin that has been suggested as a putative transactivation domain (Morett and Bork, 1999). Interestingly, these domains expressed alone or as multidomain constructs activate PS1 promoter and reduce PS2 promoter transactivation (Supplementary Figure S2A and B). Although these domains were all found active on PS promoters, it should be noted that the most potent constructs encode IBR and RING2 and that the IBR-RING2 construct appeared to be the most potent modulator of both PS1 and

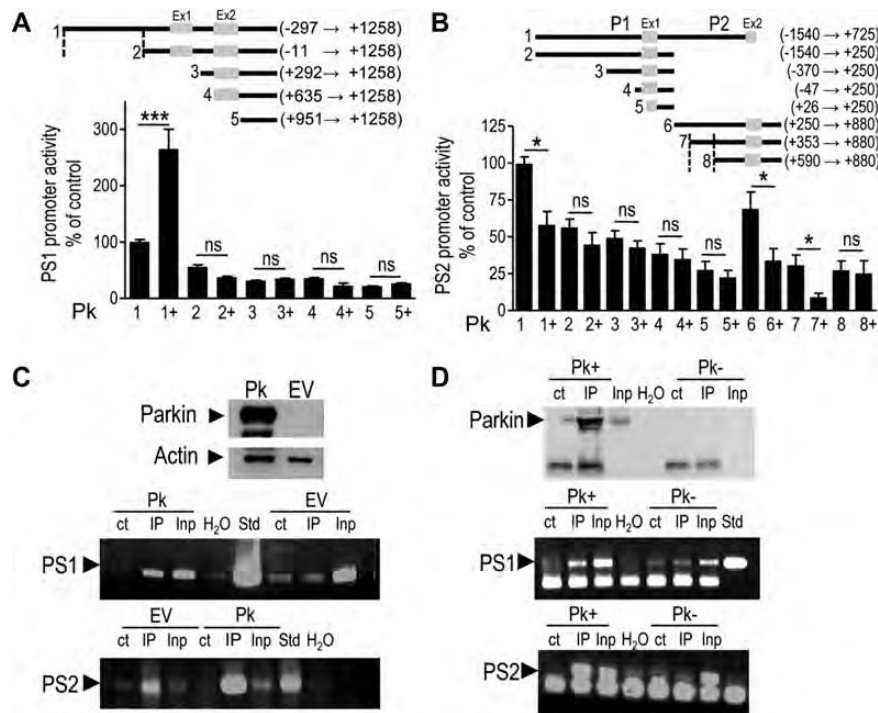


Figure 6 Parkin interacts with the human PS1 and PS2 promoters. (**A** and **B**, upper panels) Representation of the 5' end deletion constructs of the human PS1 (**A**) and PS2 (**B**) promoter regions. (**A** and **B**, lower panels) PS promoter transactivation in HEK293 cells. The indicated PS promoter-luciferase constructs (numbered as in upper panel) were co-transfected with the β -galactosidase reporter gene and either empty vector or wild-type parkin (lanes +) cDNA. The bars represent the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; ns, not statistically significant. (**C**) ChIP analyses of the interaction of parkin with the human PS1 and PS2 promoter in HEK293 cells stably overexpressing either the empty vector (EV) or wild-type parkin (Pk). (**D**) ChIP analyses of the interaction of endogenous parkin with the human PS1 and PS2 promoter in wild-type (Pk+) and *parkin null* (Pk-) fibroblasts. Agarose gels in **C** and **D** represent PCR products obtained with the PCR primers covering the -297/-11 region of the human PS1 promoter or the +353/+590 region of the human PS2 promoter. IP lanes represent immunoprecipitations with specific parkin antibodies (note that Mab5512 specifically immunoprecipitate a band corresponding to parkin in wild-type but not in null fibroblasts, **D**, upper panel); Inp lanes represent the DNA inputs in the indicated cells. Ct lanes represent ChIP with non-correlated antibodies (IgG control). Std lanes represent PCR products of human PS1 and PS2 promoter constructs.

PS2 promoter transactivation. Overall, this indicates that parkin-associated modulation of PS1 and PS2 promoters requires a multidomain centered around its RING1-IBR-RING2 as it was described for parkin-p53 interaction (da Costa et al., 2009).

Discussion

The canonical function of parkin has been established as a ubiquitin ligase and several studies supported the idea that a loss of function of parkin could be tightly linked to an accumulation of potentially toxic proteins due to a malfunction of the proteasomal machinery (Corti et al., 2011). Besides this degradation-oriented function, contributions of parkin in the control of various cell signaling pathways via protein mono-ubiquitylation have also been delineated (Corti et al., 2011). Thus, parkin can modulate the PI(3)-kinase-Akt-dependent EGF signaling via the mono-ubiquitylation of the endocytic adaptor protein Eps-15 (Fallon et al., 2006); parkin mediates Pick-1 mono-ubiquitylation, thereby abrogating Pick-1-linked control acid-sensing channels (Joch et al., 2007) and parkin-associated multi mono-ubiquitylation of the chaperone protein Hsp70 accounts for the repression of c-Jun NH2-terminal kinase signaling cascade (Liu et al., 2008).

Besides its involvement in protein degradation and cell signaling, parkin could also contribute to additional functions. Thus, parkin regulates the gene expression of several proteins, including CHK, EIF4EBP1, GADD45A, and PTPN-5 (Unschuld et al., 2006), represses monoamine oxydases A and B expressions in dopaminergic neuroblastoma cells (Jiang et al., 2006), and enhances transcription and replication of mitochondrial DNA (Kuroda et al., 2006). Furthermore, drosophila parkin reduces JNK signaling via the decrease of *bsk* transcription (Hwang et al., 2010). However, the delineation of the mechanistic aspects accounting for parkin-mediated control of gene expression remained unclear, and one could postulate either a direct role of parkin as transcriptional modulator of promoter transactivation or alternatively, an indirect ligase-dependent or independent effect due to the protein fate control of cellular intermediate transcription factors regulating the expression of the above-cited genes.

We recently established a totally novel ubiquitin-ligase independent function of parkin as a transcriptional factor (da Costa et al., 2009). This study identified the pro-apoptotic tumor suppressor p53 as the first transcriptional target of parkin. Thus, we showed that parkin downregulates p53 protein levels

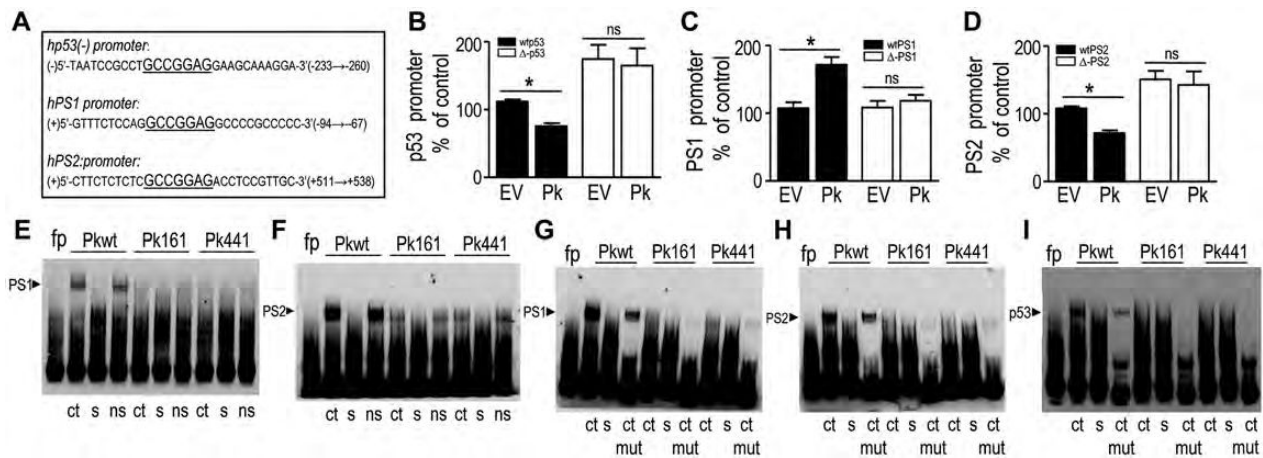


Figure 7 Parkin-related consensus binding sequence and functional analysis. **(A)** Alignment of the functional promoter region targeted by parkin and validated by ChIP analyses for PS1, PS2 (see Figure 6), and p53 (see da Costa et al., 2009) reveals a putative consensus parkin binding sequence (underlined). **(B–D)** The indicated wild-type (wtp53, wtPS1, wtPS2) and mutated (Δ p53, Δ PS1, Δ PS2) p53, PS1, and PS2 promoter-luciferase constructs were co-transfected with the β -galactosidase reporter gene and either empty vector (EV) or wild-type parkin (Pk) cDNAs. The bars represent the means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in quintuplicate. * $P < 0.05$; ns, not statistically significant. **(E–I)** EMSA analyses of the interaction of wild-type (Pkw) or mutant recombinant parkin (Pk161 or Pk441) with wild-type (ct) or mutant (ct mut) probes encompassing the consensus sequence shown in **A**. Experiments were carried out as described in Methods in the absence or in the presence of an excess of either specific (s) or non specific (ns) cold probes and analyzed as described in Methods. fp, free probes. Parkin transient expression representative of Figure 7B–D is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 7, left panel). The characterization of recombinant wild-type and mutant parkin used in Figure 7E–I is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 7, right panel).

and activity, and we established that wild-type but not mutants (either ligase-defective or not) of parkin physically interacts with p53 via its Ring1 domain and thereby, acted as a direct genuine transcriptional repressor of p53 (da Costa et al., 2009). These data highlighted the fact that the transcription factor function of parkin could be at the origin of several of its phenotypes yet to be mechanistically unraveled.

It had been described that parkin could interfere with A β regulation, the culprit of AD pathology, but the mechanism of such modulation remained unknown (Burns et al., 2009). A β derives from the proteolytic cleavage of a transmembrane precursor protein (β -amyloid precursor protein) by the two proteases β - and γ -secretases, which act sequentially (Checler, 1995). PS1 has been characterized as the catalytic core of a high-molecular-weight complex bearing γ -secretase activity responsible for productions of A β and its C-terminal counterpart AICD (Wolfe et al., 1999). Interestingly, it has been reported that PS1 transcriptional regulation indeed influences γ -secretase activity (Lee and Das, 2010).

Here we document PS1 and PS2 as novel transcriptional targets of parkin. This demonstration stands in four lines of independent data. First, both endogenous and overexpressed parkin increase/reduce PS1/PS2 promoter transactivation and protein and mRNA expression in distinct cell types including neurons, *ex vivo* as well as *in vivo*, in mouse brains. Second, parkin-mediated control of PS1/2 transcription is abolished by mutations inactivating or not its ligase activity, a feature reminiscent of that observed for well-characterized parkin-mediated control of p53 transcription (da Costa et al., 2009). Third, ChIP analyses demonstrate that endogenous and overexpressed parkin physically interacts with PS1 and PS2 promoters. Fourth, electrophoretic mobility shift assays

(EMSA) demonstrated that recombinant wild-type but not mutant parkin physically interacts with probes covering the promoter domains of PS1 and PS2 involved in parkin-mediated transcriptional modulation.

It is of importance to underline that we have shown that parkin-mediated control of PS1 and PS2 has functional consequences. Thus, parkin enhances PS1-associated γ -secretase-mediated productions of A β . A β production/secretion could be affected by several paradigms, including the cellular levels of its precursor β APP (β -amyloid precursor protein), the regulation of its secretion within the constitutive secretory pathway, and the overall activity of the γ -secretase complex that is mainly driven by PS1 expression levels (Takasugi et al., 2003). It was, therefore, important to analyze the effect of parkin on PS1-mediated γ -secretase by means of an *in vitro* assay based on monitoring A β and AICD productions from an exogenous recombinant substrate. Our data show that parkin transcriptional regulation of PS1 directly impacts on γ -secretase activity and by consequence, on the production of A β and AICD. Our study also demonstrates that parkin-mediated control of PS2 promoter transactivation influences its caspase-3 associated control of cell death (Alves da Costa et al., 2002).

An important aspect of our study concerns the fact that parkin-associated control of both PS1 and PS2 promoter transactivation remains p53 independent. This is interesting because p53, which behaves as a parkin transcriptional target (da Costa et al., 2009), can modulate the expression of several members of the γ -secretase complex (Dunys et al., 2009; Checler et al., 2010) as well as caspase-3-dependent cell death (Cregan et al., 1999). Therefore, our study suggests that parkin can influence

A β production either by acting directly on the PS1 promoter or by indirectly controlling γ -secretase by a p53-dependent mechanism. On the other hand, parkin-mediated control of cell death can occur by directly repressing PS2 (present study) or by down-regulating p53 (Alves da Costa et al., 2002). The multiplicity of parkin-driven pathways likely allows cells to face distinct situations and adapt its response according to the cellular insults.

Is parkin-mediated modulation of PS1 potentially important in AD context? It has been documented that parkin-like immunoreactivity co-localizes with A β -related vascular lesions in AD-affected brains (Witte et al., 2009). Furthermore, in sporadic AD, there is little evidence of enhanced production of A β but it is rather admitted that A β degradation could be impaired at late stages of the disease. Accordingly, parkin can trigger ubiquitinylation and degradation of intracellular A β 42 (Burns et al., 2009; Rosen et al., 2010). This could appear paradoxical with respect to our demonstration that parkin upregulates PS1-dependent γ -secretase activity. However, it should be kept in mind that AICD, the production of which derives from PS1-dependent γ -secretase activity (Passer et al., 2000; Pardossi-Piquard and Checler, 2011), could contribute to the pathology by enhancing the transcription of GSK3 β (Ryan and Pimplikar, 2005), neprilysin (Pardossi-Piquard et al., 2005; 2006; Belyaev et al., 2009), and p53 (Alves da Costa et al., 2006; Ozaki et al., 2006), thereby triggering Tau hyperphosphorylation (Sergeant et al., 2008; Iqbal et al., 2010; Medina and Avila, 2010), augmentation of A β 42/40 ratio (Kuperstein et al., 2010), and p53-dependent cell death (Kitamura et al., 1997; Garcia-Ospina et al., 2003; Ohyaig, 2008), which are all enhanced in AD pathology. Therefore, it is tempting to speculate that the increase of parkin expression in sporadic AD (Witte et al., 2009) and its mediated enhancement of γ -secretase activity (present study) could potentially contribute, at least in part, to AD neurodegenerative process. One should not, however, rule out the possibility that parkin-mediated enhancement of PS1 activity could influence the processing of many of its documented substrates (De Strooper and Annaert, 2010) that, besides β APP, could contribute to either AD-related or unrelated functions.

Our study has two other fundamental implications besides the fact that it strengthens our initial description of a role of transcription factor for parkin (da Costa et al., 2009; da Costa and Checler, 2010) by identifying two novels targets. First, it shows that parkin could act either as a transcriptional activator or as a repressor. Such a duality has been previously reported for other transcription factors such as p53 (Rinn and Huarte, 2011) and might be due to motif context, competition with other actors of the transcriptional machinery, or recruitment of chromatin repressor and/or activator factors (Rinn and Huarte, 2011). Putative additional co-factors or above-described altered mechanisms have yet to be identified for parkin-associated transcriptional function. It remains that this differential effect as a repressor of two pro-apoptotic proteins (i.e. p53 and PS2) and as an activator of a protective effector (PS1) also suggests a coordinated function of parkin in the modulation of cellular cell death. This cellular mechanism of control could complete in an additive or synergistic manner, the ligase-dependent function of parkin in the control of the fate of other negative modulators of cell death. Second, in support of the previous point, we

have delineated a common GCCGGAG heptamer motif in the promoters of PS1, PS2, and p53, the deletion of which abolishes parkin-mediated promoter transactivation.

It should be noted here that the heptamer sequence described above likely does not account for the whole structural features underlying parkin-associated transcriptional function. Thus, although wild-type but not mutated recombinant parkin physically interact with probes bearing this heptamer domain, wild-type (but not mutated) parkin also interacts, although with a drastically reduced efficiency, with identical probes in which the heptamer sequence had been mutated. This could mean that either the identified heptamer is part, but not all, of the consensus sequence or additional co-factors present in cells and organisms contribute to the modulation of the affinity of parkin for this sequence. The latter hypothesis is likely, since it would be difficult to envision that both activation and repression effects of parkin are due to the sole interaction with this unique domain without associated modulators. Accordingly, it should be emphasized that the RING1-IBR-RING2 domain of parkin responsible for PS transcriptional modulation is apparently wider than the sole RING1 domain sufficient to mediate parkin-associated repression of p53 (da Costa et al., 2009). The above set of data underlies the potential 'plasticity' in the structural requirements for parkin transcriptional function and that such a duality may depend upon the cellular context and molecular environment ultimately conditioning its phenotype. This also likely explains why mutations located outside the RING1-IBR-RING2 domain abolish parkin-mediated control of PS promoter transactivation. Overall, our work should allow the identification of novel transcriptional targets of parkin that would explain some of its known functions mechanistically yet unsolved or unravel additional putative cell-specific functions.

Materials and methods

Promoter activity assays and mapping of parkin functional domain

p53, PS1, and PS2 promoter-luciferase constructs have been previously described (Bienz-Tadmor et al., 1985; Mitsuda et al., 1997; Ounallah-Saad et al., 2009). Promoter constructs deleted of the parkin potential binding site as well as PS1 promoter truncation constructs have been obtained as described above. Promoter-luciferase activities were measured after co-transfection of 0.5–1 μ g of the above cDNAs and 0.2–0.5 μ g of β -galactosidase cDNA in order to normalize transfection efficiencies. For the experiences concerning the mapping of parkin domain involved in presenilins promoter regulation, we have co-transfected SH-SY5Y cells with 1 μ g of the full-length PS promoter-luciferase constructs, 0.5 μ g of the β -galactosidase, and 1 μ g of either full-length or distinct HA-tagged parkin deleted constructs corresponding to its previously described Ring 1, IBR, and Ring 2 domains. The truncated HA-tagged parkin constructs have been graciously provided by Dr T. Dawson and have been described in Chung et al. (2001).

Caspase-3 activity measurements

Cells were grown in 6-well plates and incubated without or with TPS (1 μ M) for 15 h. Caspase-3-like enzymatic activity was

measured fluorimetrically by means of a microtiter plate reader (Labsystems, Fisher Bioblock Scientific) as extensively detailed (Alves da Costa et al., 2000).

In vitro γ -secretase assay

The production of the C100-Flag fragment, the preparation of the 'solubilized' membranes fraction, and the *in vitro* γ -secretase assay were described in detail in a previous study (Sevalle et al., 2009). Briefly, 'solubilized membranes' (5 μ l) from TSM1 neurons expressing empty vector or wild-type HA-tagged parkin or from wild-type and parkin-deleted fibroblasts, diluted in sodium citrate buffer, were incubated with 10 μ l of reaction buffer containing recombinant C100-Flag (50 μ g/ml). The 20 μ l resulting reaction mixes were incubated over constant agitation for 16 h at 37°C. Samples were then supplemented with 2 $\times$ Tris–Tricine loading buffer, boiled for 5 min, and subjected to western blot using 16% SDS-PAGE Tris–Tricine gel and then A β and AICD were analyzed with antibodies described below.

Western blot analysis

Parkin knockout murine brains have been recently described (Goldberg et al., 2003). Cellular and mouse brain extracted proteins (50 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE gels and wet-transferred to Hybond-C (Amersham Life Science) membranes. Immunoblotting was performed by means of either anti-N-terminal PS1 and anti-PS2 loop antibodies (a gracious gift of Dr G. Thinakaran) or anti-PS1 (Ab111) and anti-PS2 (Ab333) antibodies (provided by Drs Araki and Tabira), mouse monoclonal anti-parkin (MAB5512, Chemicon), and anti-actin antibodies (Sigma). For A β detection, we used the 6E10 monoclonal antibody (AbCam) at a 1/1000 dilution. AICD immunoreactivity was analyzed by using the anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma) at a 1/1000 dilution. Protein immunoreactivities were revealed with either an anti-rabbit peroxidase or an anti-mouse peroxidase (Jackson ImmunoResearch) by the electrochemoluminescence method (Roche Diagnostics S.A.S). Chemiluminescence was recorded using a luminescence image analyzer LAS-3000 (Raytest), and quantification of images was performed using the FUJI FILM Multi Gauge/AIDA image analyzer software.

Primary cultured neurons

Primary neuron cultures were prepared from gestational day 14 fetal of C57BL/6 fetuses (Charles Rivers) by a slightly modified procedure of Vincent et al. (1996). Briefly, brain hemispheres were placed in the plating Neurobasal media (Life Technologies) supplemented with 2% B-27, 0.5 mM L-glutamine, and 50 U/ml penicillin/streptomycin and dissociated by mechanical trituration. Cells were centrifuged at 200 $\times$ g for 5 min and resuspended in the plating media. Three million cells were plated on 6-well plates coated with poly-L-ornithine and were maintained in the plating media at 37°C in a 7% CO₂ humidified incubator. The growth medium was refreshed once every third day. After ten days, cells were transfected by means of the lipofectamine 2000 reagent according to manufacturer conditions, and 48 h post transfection, the cells were harvested according to the follow-up procedure of analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the PRISM software (GraphPad Software, San Diego, CA) by using either the Student *t*-test or Newmann-Keuls multiple comparison tests for one-way analysis of variance.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Journal of Molecular Cell Biology* online.

Acknowledgments

Drs T. Dawson, B. de Strooper (University of Leuven, Belgium), M. Roussel St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA), J. Shen (Harvard Medical School, Boston, USA), T. Tabira (Juntendo University, Tokyo, Japan), and G. Thinakaran (University of Chicago, USA) are warmly thanked for providing us with some antibodies, RING, IBR, and IBR-RING constructs, knockout cells, and mouse brains. The promoter constructs from M. Oren (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) and M. Vitek (Cognosci, Inc, Research Triangle Park, USA) are acknowledged. We thank Ms Rosa Ferrando-Miguel (CRICM, Paris, France) for her help in recombinant protein production.

Funding

This work was supported by the 'Fondation pour la Recherche Médicale' and by the 'Conseil Général des Alpes Maritimes'. This work has been developed and supported through the LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). J.V. is supported by the Association Monégasque pour la recherche contre la Maladie d'Alzheimer.

Conflict of interest: none declared.

References

- Alves da Costa, C., Ancolio, K., and Checler, F. (2000). Wild-type but not Parkinson's disease-related Ala53Thr- α -synuclein protect neuronal cells from apoptotic stimuli. *J. Biol. Chem.* 275, 24065–24069.
- Alves da Costa, C., Paitel, E., Mattson, M.P., et al. (2002). Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 4043–4048.
- Alves da Costa, C., Sunyach, C., Pardossi-Piquard, R., et al. (2006). Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 26, 6377–6385.
- Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., Makova, N.Z., et al. (2009). Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep.* 10, 94–100.
- Bienz-Tadmor, B., Zakut-Houri, R., Libresco, S., et al. (1985). The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J.* 4, 3209–3213.
- Burns, M.P., Zhang, L., Rebeck, G.W., et al. (2009). Parkin promotes intracellular Abeta1–42 clearance. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3206–3216.
- Checler, F. (1995). Processing of the β -amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 65, 1431–1444.
- Checler, F. (1999). Presenilins: multifunctional proteins involved in Alzheimer's disease pathology. *IUBMB Life* 48, 33–39.
- Checler, F., Dunys, J., Pardossi-Piquard, R., et al. (2010). p53 is regulated by and regulates members of the gamma-secretase complex. *Neurodegener. Dis.* 7, 50–55.
- Chung, K.K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., et al. (2001). Parkin ubiquitinates the α -synuclein-interacting protein synphilin-1: implications for lewy-body formation in parkinson disease. *Nat. Med.* 7, 1144–1150.
- Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol. Rev.* 91, 1161–1218.
- Cregan, S.P., Maclaurin, J.G., Craig, C.G., et al. (1999). Bax-dependent

- caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.* 19, 7860–7869.
- da Costa, C.A., and Checler, F. (2010). A novel parkin-mediated transcriptional function links p53 to familial Parkinson's disease. *Cell Cycle* 9, 16–17.
- da Costa, C.A., Sunyach, C., Giaime, E., et al. (2009). Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat. Cell Biol.* 11, 1370–1375.
- Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2010). The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 25(Suppl 1), S32–S39.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2010). Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 235–260.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., et al. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391, 387–390.
- Dunys, J., Sevalle, J., Giaime, E., et al. (2009). p53-dependent control of transactivation of the Pen2 promoter by presenilins. *J. Cell Sci.* 122, 4003–4008.
- Fallon, L., Belanger, C.M., Corera, A.T., et al. (2006). A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat. Cell Biol.* 8, 834–842.
- Garcia-Ospina, G.P., Ginenez-del Rio, M., Lopera, F., et al. (2003). Neuronal DNA damage correlates with a positive detection of c-Jun, nuclear factor κ B, p53 and Par-4 transcription factors in Alzheimer's disease. *Rev. Neurol.* 36, 1004–1010.
- Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacino, J.J., et al. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 43628–43635.
- Hwang, S., Kim, D., Choi, G., et al. (2010). Parkin suppresses c-Jun N-terminal kinase-induced cell death via transcriptional regulation in *Drosophila*. *Mol. Cells* 29, 575–580.
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., et al. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 656–664.
- Jiang, H., Jiang, Q., Liu, W., et al. (2006). Parkin suppresses the expression of monoamine oxidases. *J. Biol. Chem.* 281, 8591–8599.
- Joch, M., Ase, A.R., Chen, C.X., et al. (2007). Parkin-mediated monoubiquitination of the PDZ protein PICK1 regulates the activity of acid-sensing ion channels. *Mol. Biol. Cell* 18, 3105–3118.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M., et al. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}. *Cell* 91, 649–659.
- Kang, D.E., Yoon, I.S., Repetto, E., et al. (2005). Presenilins mediate PI3K/AKT and ERK activation via select signaling receptors: selectivity of PS2 in PDGF signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 31537–31547.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Kamoshima, W., et al. (1997). Changes of p53 in the brains patients with Alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 418–421.
- Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., et al. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J.* 29, 3408–3420.
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., et al. (2006). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum. Mol. Genet.* 15, 883–895.
- Lee, S., and Das, H.K. (2010). Transcriptional regulation of the presenilin-1 gene controls gamma-secretase activity. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 2, 22–35.
- Liu, M., Aneja, R., Sun, X., et al. (2008). Parkin regulates Eg5 expression by Hsp70 ubiquitination-dependent inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 35783–35788.
- Medina, M., and Avila, J. (2010). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* 16, 2790–2798.
- Mitsuda, N., Roses, A.D., and Vitek, M.P. (1997). Transcriptional regulation of the mouse presenilin-1 gene. *J. Biol. Chem.* 272, 23489–23497.
- Morett, E., and Bork, P. (1999). A novel transactivation domain in parkin. *Trends in Biochem. Sci.* 24, 229–231.
- Ohya, Y. (2008). Intracellular amyloid beta-protein as a therapeutic target for treating Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 5, 555–561.
- Ounallah-Saad, H., Beeri, R., Goshen, I., et al. (2009). Transcriptional regulation of the murine presenilin-2 gene reveals similarities and differences to its human orthologue. *Gene* 4456, 81–89.
- Ozaki, T., Li, Y., Kikuchi, H., et al. (2006). The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 57–63.
- Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2011). The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J. Neurochem.* 120(Suppl 1), 109–124.
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawai, T., et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the A β -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46, 541–554.
- Pardossi-Piquard, R., Dunys, J., Yu, G., et al. (2006). Neprilysin activity and expression are controlled by nicastrin. *J. Neurochem.* 97, 1052–1056.
- Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., et al. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by γ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid β protein precursor. *J. Alzheimers Dis.* 2, 289–301.
- Pastorcic, M., and Das, H.K. (2000). Regulation of transcription of the human presenilin-1 gene by Ets transcription factor and the p53 protooncogene. *J. Biol. Chem.* 275, 34938–34945.
- Rinn, J.L., and Huarte, M. (2011). To repress or not to repress: this is the guardian's question. *Trends Cell Biol.* 21, 344–353.
- Roperch, J.-P., Alvaro, V., Prieur, S., et al. (1998). Inhibition of presenilin1 expression is promoted by p53 and p21^{WAF-1} and results in apoptosis and tumor suppression. *Nat. Med.* 4, 835–838.
- Rosen, K.M., Moussa, C.E., Lee, H.K., et al. (2010). Parkin reverses intracellular beta-amyloid accumulation and its negative effects on proteasome function. *J. Neurosci. Res.* 88, 167–178.
- Ryan, K.A., and Pimplikar, S.W. (2005). Activation of GSK3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J. Cell Biol.* 171, 327–335.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* 5, 207–224.
- Sevalle, J., Amoyel, A., Robert, P., et al. (2009). Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* 109, 248–256.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302–305.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., et al. (2003). The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature* 422, 438–441.
- Unschuld, P.G., Dachselt, J., Darios, F., et al. (2006). Parkin modulates gene expression in control and ceramide-treated PC12 cells. *Mol. Biol. Rep.* 33, 13–32.
- Vincent, B., Beaudet, A., Dauch, P., et al. (1996). Distinct properties of neuronal and astrocytic endopeptidase 3.4.24.16: a study on differentiation, subcellular distribution and secretion processes. *J. Neurosci.* 16, 5049–5059.
- Witte, M.E., Bol, J.G., Gerritsen, W.H., et al. (2009). Parkinson's disease-associated parkin colocalizes with Alzheimer's disease and multiple sclerosis brain lesions. *Neurobiol. Dis.* 36, 445–452.
- Wolfe, M.S. (2001). Secretase targets for Alzheimer's disease: identification and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* 44, 2039–2060.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., et al. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513–517.

Les présénilines sont des protéines membres du complexe γ -sécrétase et sont donc des acteurs majeurs de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Elles sont responsables de la plupart des formes familiales de la pathologie de par leur rôle majeur dans le clivage du peptide A β . Plusieurs études pointent le fait que p53 pourrait réguler les PS.

La parkine est quant-à-elle caractérisée dans la maladie de Parkinson où son rôle canonique est celui d'ubiquitine ligase, mais nous savons également qu'elle peut réprimer l'expression de p53 au niveau transcriptionnel.

Le but de ce travail a donc été de voir si la parkine pouvait réguler l'expression des présénilines et si cette régulation était dépendante de p53.

La parkine endogène est surexprimée et contrôle la transcription des présénilines.

Nous avons utilisé une lignée cellulaire surexprimant la parkine stablement. Il apparaît que celle-ci, augmente l'expression de PS1 au niveau protéique, de l'ARNm et l'activité du promoteur ; elle diminue également l'expression protéique et l'ARNm de PS2 ainsi que l'activité de son promoteur. Dans un modèle cellulaire invalidé ou non pour la parkine, les MEF (Mouse Embryonic Fibroblast), nous observons qu'en l'absence de parkine, il y a une baisse de l'expression de l'ARNm et de l'activité du promoteur de PS1 ainsi qu'une augmentation de ces mêmes paramètres pour PS2.

Ces résultats montrent que la parkine est capable de réguler les présénilines et constituent la première étape de cette étude.

Effet de la parkine sur les fonctions associées au présénilines.

Nous avons voulu voir l'effet de cette régulation sur le clivage γ -sécrétase. Pour cela nous avons réalisé un essai *in vitro* durant lequel nous mesurons l'activité de la γ -sécrétase à l'aide d'un substrat recombinant le C100 [321]. La surexpression de la parkine entraîne une augmentation de l'expression de l'A β ainsi que de l'AICD, alors que son invalidation entraîne une diminution de l'expression de ces composés. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de cellules invalidées pour la parkine. La parkine a alors un effet activateur sur le clivage γ -sécrétase et donc sur l'activité des PS.

Les présénilines sont connues pour porter une fonction apoptotique en contrôlant la mort cellulaire. Plus exactement PS1 possède un phénotype anti-apoptotique alors que PS2 est pro-apoptotique. Nous avons donc induit un stress réticulaire par l'utilisation de thapsigargine (TPS) et mesuré l'activité de la caspase-3. Nos résultats indiquent que la surexpression de la parkine ou de PS1 entraîne une diminution de l'activité caspase-3, alors que la surexpression de PS2 induit une augmentation de cette activité. A l'inverse, l'invalidation de la parkine ou de PS1 entraîne une augmentation de l'activité caspase-3, alors que l'invalidation de PS2 à l'effet contraire. Ceci montre que la parkine est capable de moduler l'activité des PS sur l'apoptose. Lors de la co-invalidité de PS1 et PS2, nous observons une diminution de l'activité caspase-3 ce qui suggère un effet dominant de PS2. La surexpression de la parkine dans ce modèle induit une inhibition de l'activation de la caspase 3 et donc un effet similaire à celui de PS2.

Ces résultats indiquent que la parkine a clairement un rôle dans le contrôle de l'activité γ -sécrétase induit par PS1 et le contrôle de l'apoptose induit par PS2.

Le contrôle de la parkine sur l'expression des PS est indépendant de son activité d'ubiquitine ligase.

Pour mettre en évidence la contribution de la fonction ubiquitine ligase sur la régulation des PS par la parkine nous avons utilisé deux mutants connus pour inactiver (418) ou pas (161)

cette fonction. La transfection dans des cellules SH-SY5Y de la parkine sauvage a permis de confirmer l'effet de la parkine sauvage sur les PS. L'utilisation des mutants abolit l'augmentation d'expression protéique, de l'ARNm, de l'activité du promoteur observé sur PS1 et diminue des mêmes paramètres observés sur PS2. Nous avons confirmé ces résultats dans un modèle cellulaire ne possédant pas de parkine endogène.

Les mutants utilisés ici sont connus pour abolir l'activation de la caspase-3 et la répression de p53 dans ces mêmes modèles cellulaires. Dans le cas présent, leur inactivité montre que la régulation des PS par la parkine est indépendante de son activité ubiquitine ligase.

La régulation des PS est indépendante de p53 et ne fait pas intervenir le contrôle réciproque des PS l'une sur l'autre.

Le contrôle des PS étant indépendant de l'activité ubiquitine ligase de la parkine, et sachant que p53 est réprimé transcriptionnellement par la parkine [119] et qu'il semble pouvoir contrôler l'expression de PS1 [322, 323] nous avons émis l'hypothèse que p53 pouvait jouer le rôle d'intermédiaire. De plus, il existe un dialogue fonctionnel entre PS1 et PS2 [324, 325] pouvant prendre part dans cette régulation.

La contribution de p53 a été mise en évidence en utilisant des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) ARF^{-/-} et ARF^{-/-} p53^{-/-}. Ce sont des cellules invalidées en p53 mais qui ont la particularité d'être également invalidées en ARF ce qui permet de voir la contribution de p53 à l'apoptose sans interférer avec son rôle dans le cycle cellulaire. L'invalidation de p53 est responsable de l'augmentation de l'expression de l'ARNm et de l'activité promoteur de PS1 (Figure 5A et 5B). Cependant, dans ces modèles cellulaires, la parkine conserve ces effets sur PS1 et PS2 dans les ARF^{-/-}, mais aussi dans les cellules invalidées en p53 ce qui montre que ces effets ne dépendent pas de p53.

Nous avons mesuré les niveaux d'expression protéique, d'ARNm et d'activation du promoteur de chacune des présénilines dans des cellules invalidées pour l'autre préséniline en condition de surexpression de la parkine. Il apparaît alors que la parkine garde son rôle activateur sur PS1 dans un modèle de cellules invalidées pour PS2 et son rôle inhibiteur sur PS2 dans des cellules invalidées pour PS1. Ces expériences ont permis d'étudier la contribution du dialogue fonctionnel entre les PS dans la régulation des PS par la parkine.

PS1 et PS2 sont des cibles transcriptionnelles de la parkine.

Nous avons alors cherché à mettre en évidence le rôle de la parkine sur la transcription des PS. La première étape a été de réaliser des troncations des promoteurs de PS1 et de PS2. Cela a permis de localiser les zones sur lesquelles semblaient se fixer la parkine. Nous avons alors réalisé des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine avec des amorces spécifiquement dessinées pour couvrir les régions précédemment observées. Cela nous a permis de confirmer que la parkine interagit physiquement avec le promoteur de PS1 et de PS2.

Identification de la séquence consensus de fixation de la parkine.

Une étude *in silico* du promoteur des trois cibles connus de la parkine (p53, PS1 et PS2) a permis de mettre en évidence une séquence commune présente dans les zones d'interaction connues de la parkine avec ces trois promoteurs. Il s'agit d'un heptamère GCCGAG dont nous avons réalisé la délétion sur ces trois promoteurs. Il en résulte une perte de l'effet de la parkine.

Pour confirmer ces résultats nous avons alors produit deux protéines recombinantes, une parkine sauvage et une parkine mutée et réalisé des expériences de retard sur gel avec des sondes correspondant aux séquences de PS1 et PS2 caractérisées précédemment. Seule la parkine sauvage est capable d'interagir avec les sondes PS1 et PS2.

Ces deux résultats sont fondamentaux puisqu'ils confirment le rôle facteur de transcription de la parkine sur les PS et permettent de mieux comprendre cette fonction, notamment par la découverte de la séquence consensus.

Conclusion.

Ce projet, a permis de mieux comprendre le mécanisme de fonction facteur de transcription en mettant en évidence une séquence consensus de fixation de la parkine sur l'ADN. Nous avons également mis en évidence que la parkine peut exercer une fonction activatrice ou inhibitrice.

D'un point de vu plus fonctionnel, notre étude a mis en évidence le contrôle de la parkine sur les présénilines. Elle est activatrice sur PS1 et inhibitrice sur PS2. Cette action se déroule au niveau transcriptionnel et fait intervenir directement la parkine sans l'intermédiaire de p53, PS1 ou PS2. L'activation de PS1 par la parkine a pour effet d'augmenter l'activité γ -sécrétase, alors que l'inhibition de PS2 abolit l'effet pro-apoptotique de celle-ci lorsque l'on mesure l'activité de la caspase-3.

Contribution personnelle à ce projet.

Mon travail sur cet article a été d'étudier l'implication de la fonction ubiquitine ligase de la parkine sur le contrôle des préséniles et rôle de p53 dans cette régulation. Pour cela j'ai réalisé des expériences d'immunoempreintes, des qPCR et des mesures de l'activité promoteur des préséniles dans des cellules surexprimant la parkine mutée ou non (figure 4). J'ai également réalisé ces expériences dans des cellules invalidées ou non pour p53 (figure 3, tableaux A, D, C et D). J'ai participé aux expériences sur les cerveaux de souris invalidées en parkine, en prélevant et en préparant les échantillons, et en réalisant certaines des expériences d'immunoempreintes (figure 1 tableaux J et K). J'ai enfin réalisé les mesures de l'activité transcriptionnelle des promoteurs des PS1 et 2 sur lesquels les sites de fixation de la parkine ont été délétés (figure 7, tableaux C et D).

Article 2

ER-stress-associated functional link between Parkin and DJ-1 via a transcriptional cascade involving the tumor suppressor p53 and the spliced X box binding protein XBP-1

Eric Duplan, Emilie Giaime, **Julien Viotti**, Jean Sevalle, Olga Corti, Alexis Brice, Hiroyoshi Ariga, Ling Qi, Frédéric Checler et Cristine Alves da Costa

ER-stress-associated functional link between Parkin and DJ-1 via a transcriptional cascade involving the tumor suppressor p53 and the spliced X-box binding protein XBP-1

Eric Duplan¹, Emilie Giaime¹, Julien Viotti¹, Jean Sévalle¹, Olga Corti², Alexis Brice², Hiroyoshi Ariga³, Ling Qi⁴, Frédéric Checler^{1,*} and Cristine Alves da Costa^{1,*}

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275 CNRS/UNSA, Team Fondation pour la Recherche Médicale and Labex Distalz, 660 route des Lucioles, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France

²INSERM U679, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

³Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Kita 12, Nishi 6, Kitaku, Sapporo 060-0812, Japan

⁴Division of Nutritional Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

*Authors for correspondence (acosta@ipmc.cnrs.fr; checler@ipmc.cnrs.fr)

Accepted 7 February 2013

Journal of Cell Science 126, 2124–2133

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd

doi: 10.1242/jcs.127340

Summary

Parkin and DJ-1 are two multi-functional proteins linked to autosomal recessive early-onset Parkinson's disease (PD) that have been shown to functionally interact by as-yet-unknown mechanisms. We have delineated the mechanisms by which parkin controls DJ-1. Parkin modulates DJ-1 transcription and protein levels via a signaling cascade involving p53 and the endoplasmic reticulum (ER)-stress-induced active X-box-binding protein-1S (XBP-1S). Parkin triggers the transcriptional repression of p53 while p53 downregulates DJ-1 protein and mRNA expressions. We show that parkin-mediated control of DJ-1 is fully p53-dependent. Furthermore, we establish that p53 lowers the protein and mRNA levels of XBP-1S. Accordingly, we show that parkin ultimately upregulates XBP-1 levels. Subsequently, XBP-1S physically interacts with the DJ-1 promoter, thereby enhancing its promoter trans-activation, mRNA levels and protein expression. This data was corroborated by the examination of DJ-1 in both *parkin*- and *p53*-null mice brains. This transcriptional cascade is abolished by pathogenic parkin mutations and is independent of its ubiquitin-ligase activity. Our data establish a parkin-dependent ER-stress-associated modulation of DJ-1 and identifies p53 and XBP-1 as two major actors acting downstream of parkin in this signaling cascade in cells and *in vivo*. This work provides a mechanistic explanation for the increase in the unfolded protein response observed in PD pathology, i.e. that it is due to a defect in parkin-associated control of DJ-1.

Key words: Parkinson's disease, DJ-1, Parkin, Mutations, p53, XBP-1, UPR

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that is characterized by a severe loss of dopaminergic neurons of the *substantia nigra* and by the presence of intra-cytoplasmic inclusions named Lewy bodies (Moore et al., 2005a). This syndrome is mainly sporadic but a few percent of the cases are linked to a genetic origin (familial PD, FPD) and are either associated with an autosomal dominant or recessive mode of inheritance. The latter forms of the disease are usually characterized by an early onset and are mostly linked to mutations in the genes of *parkin*, *Pink-1* and *DJ-1* (Shulman et al., 2011).

DJ-1 is implicated in ~1% of autosomal recessive FPD (Abou-Sleiman et al., 2003) and has been documented as a ubiquitously expressed and highly conserved protein present as a homodimeric complex in the cytoplasm (Bandopadhyay et al., 2004). Several lines of evidence indicate that DJ-1 could act as an antioxidant (Taira et al., 2004) and could control mitochondrial function (Thomas et al., 2011), autophagy (Thomas et al., 2011) and pro-survival pathways (Giaime et al., 2010). However, only fragmentary

data concern the mechanisms by which DJ-1 transcription/ expression is regulated and whether such regulation could be controlled by physiopathological stresses or cellular challenges.

Parkin is another important FPD-associated gene product that has been characterized as an ubiquitin-ligase (Shimura et al., 2000; Tanaka et al., 2001). Interestingly, parkin was reported to interact physically with DJ-1 monomers in oxidative stress conditions (Moore et al., 2005b). However, unlike expected from its ubiquitin ligase activity, parkin did not promote DJ-1 proteasomal degradation but instead, increased its cellular stability (Moore et al., 2005b). This suggests that parkin-mediated control of DJ-1 expression could indeed reflect a functional cross-talk by which parkin could modulate DJ-1-associated functions.

Several works evidenced a major role of parkin and DJ-1 in the mitochondria, one of the major organelle targets affected in PD pathology (Dodson and Guo, 2007). However, Thomas and co-workers showed very recently that DJ-1 depletion triggers loss of mitochondrial polarization, fragmentation and increased autophagy in dopaminergic M17 cells, independently of the

parkin–Pink-1 pathway (Thomas et al., 2011). Therefore, although parkin and DJ-1 could coordinately but independently contribute to mitochondrial function, the ability of parkin to interact with DJ-1 may likely have other functional consequences.

In this context, it is noteworthy that both parkin and DJ-1 have been associated to the ER-stress response also called unfolded protein response (UPR). Thus, parkin controls both endoplasmic reticulum and oxidative stresses (Takahashi et al., 2003) and interacts with Hsp70 and some members of the ERAD (ER-associated degradation) machinery, Ubc7 and Ubc8 (Tanaka et al., 2001). Directly linked to parkin-associated ligase activity, Imai and colleagues showed that the Pael receptor that tends to be poly-ubiquitinated, unfolded and poorly soluble, *in vivo*, behaves as a parkin substrate (Imai et al., 2001). However, unrelated to parkin enzymatic properties, oxidative stress indeed enhances the physical interaction between parkin and DJ-1 (Moore et al., 2005b). We therefore questioned whether parkin could be functionally linked to DJ-1 in basal and ER-stress-induced conditions.

We show here that parkin upregulates DJ-1 promoter transactivation, mRNA levels and protein expression via a transcriptional cascade involving p53 repression and subsequent activation of ER-stress induced X-box-binding protein-1S (XBP-1S). Subsequently, XBP-1S physically interacts with DJ-1 promoter and thereby raises DJ-1 mRNA and protein levels. Interestingly, parkin-mediated control of DJ-1 remained independent of its ubiquitin-ligase activity and is abolished by PD-related pathogenic mutations. Overall, our study is the first delineation of the molecular events linking parkin and DJ-1 and unravels a functional dialogue by which these two proteins could control ER-stress response in physiopathological conditions.

Results

Parkin controls DJ-1 in cells and in mice brain

We have examined the influence of the modulation of parkin (PK) levels on DJ-1. Stably transfected TSM1 neurons overexpressing wild-type PK exhibit increased DJ-1 expression ($+82 \pm 23.4\%$, Fig. 1A), promoter trans-activation ($+41.6 \pm 5.9\%$, Fig. 1B) and mRNA levels ($+45.2 \pm 10.4$, Fig. 1C). The PK-associated upregulation of DJ-1 has been corroborated by the examination of the influence of endogenous PK depletion on DJ-1 expression. Thus, *parkin*-null fibroblasts ($PK^{-/-}$) display lower DJ-1 expression ($-49 \pm 4.7\%$ compared to control $PK^{+/+}$ fibroblasts, Fig. 1D), promoter transactivation ($-77 \pm 4.9\%$, Fig. 1E) and mRNA levels ($-30 \pm 0.8\%$, Fig. 1F). These results were similar in two distinct PK-deficient fibroblastic cell lines from distinct origins (data not shown). In order to rule out any artifactual effect linked to genetic manipulation, we have confirmed the latter set of data by the analysis of parkin depletion by a shRNA approach. As demonstrated in supplementary material Fig. S1, two distinct parkin-directed shRNAs (KD1 and KD2, see Materials and Methods) that significantly decrease parkin expression [$-53 \pm 0.3\%$ of scrambled (SC)-treated cells, for KD1 and $-35 \pm 1.3\%$, for KD2, supplementary material Fig. S1A,B] concomitantly lower DJ-1 expression ($-38 \pm 2.1\%$ of control value for KD1 and $-41 \pm 0.1\%$ for KD2, supplementary material Fig. S1B) and promoter transactivation ($-25 \pm 1.2\%$ for KD1, supplementary material Fig. S1C). In order to examine the influence of parkin, *in vivo*, we have analyzed DJ-1 expression in brain samples derived from wild-type or *parkin*-null mice (Itier et al., 2003). The

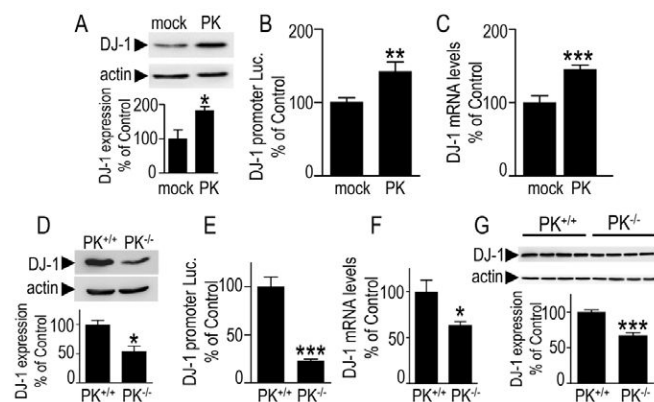


Fig. 1. Parkin modulates DJ-1 expression, promoter transactivation and mRNA levels. (A–C) TSM1 neurons were stably transfected with pcDNA3 (mock) or human *parkin* cDNA (PK) then DJ-1 expression (A), promoter transactivation (B) and mRNA levels (C) were analyzed. Bars represent the means $\pm$ s.e.m. of 4–11 independent experiments performed in triplicate (A,C) or in 6 replicates (B) and are expressed as a percentage of control mock-transfected cells. Actin was used as a loading control. (D–F) Wild-type ($PK^{+/+}$) or *parkin*-null ($PK^{-/-}$) mouse fibroblasts were analyzed for DJ-1 expression (D), promoter transactivation (E) and mRNA levels (F). Bars represent the means $\pm$ s.e.m. of 3 or 4 independent experiments performed in 3–6 replicates and are expressed as a percentage of control wild-type fibroblasts. (G) DJ-1 and actin immunoreactivities were determined in homogenates derived from $PK^{+/+}$ and $PK^{-/-}$ mice brains. Bars represent the densitometric analyses of DJ-1 expression and are means $\pm$ s.e.m. of 4 brains. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with controls.

depletion of parkin leads to the reduction of DJ-1 expression ($-33 \pm 2\%$ of control $PK^{+/+}$ brains, Fig. 1G), indicating that PK controls DJ-1 in both cellular models and *in vivo*.

The number of yet available parkin-associated human brain samples is extremely low and corresponds to a maximum of six worldwide. It is therefore very difficult to assess whether PK mutations responsible for FPD also trigger decreased DJ-1 expression in pathogenic human brains. However, we had the opportunity to examine two of these samples in which a parkin missense mutation and deletion (FPD) have been identified (da Costa et al., 2009). We observed a diminution of DJ-1 expression (about 25% reduction versus control brains, data not shown). Although it is obviously hard to draw any firm conclusion, it remains that loss of function parkin mutation could also trigger DJ-1 reduction in human PD-affected brains.

PD-associated parkin mutations abolish PK-mediated control of DJ-1

The human SH-SY5Y neuroblastoma cell line is a relevant dopaminergic cell model widely used in cell biology approaches of PD pathology. We have first confirmed that transient overexpression of PK in these cells also triggers increased DJ-1 expression ($+44.4 \pm 7.8\%$ of control EV-transfected cells, Fig. 2A,B), promoter transactivation ($+21 \pm 1.5\%$, Fig. 2C) and mRNA levels ($+31 \pm 1.7\%$, Fig. 2D). Interestingly, two familial PD-associated mutations known to abolish (C418R) or preserve (K161N) the PK-linked ubiquitin-ligase activity both block these augmentations (Fig. 2A–D). It should be noted that the transient transfection of PK mutant cDNAs led to various expressions (Fig. 2A) that are not due to variability of transfection efficiency as evidenced by similar GFP expression (GFP coding sequence is

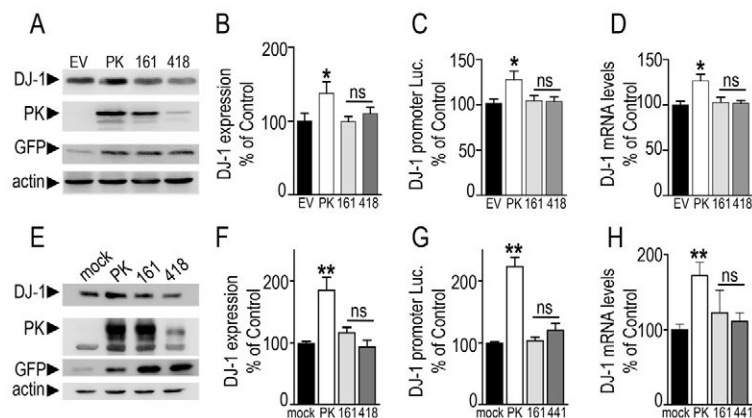


Fig. 2. Familial Parkinson's disease-associated mutations abolish parkin-mediated regulation of DJ-1. (A–D) SH-SY5Y human neuroblastoma cells were transiently transfected with the indicated cDNAs (EV, empty pIRES2-EGFP vector; PK, wild-type parkin; 161, K161-PK; 418, C418R-PK). Twenty-four hours after transfection, cells were examined for DJ-1, parkin, GFP and actin-like immunoreactivities (A,B), human DJ-1 promoter transactivation (C) and *DJ-1* mRNA levels (D). Bars represent the means $\pm$ s.e.m. of 6–12 independent experiments and are expressed as a percentage of control EV-transfected cells. (E–H) HEK293 human embryonic kidney cells were stably transfected with the indicated cDNAs and analyzed for DJ-1 expression (E,F), promoter transactivation (G) and mRNA levels (H). Bars represent means $\pm$ s.e.m. of 2 independent experiments performed in 3–6 replicates and are expressed as a percentage of control mock-transfected cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with controls; ns, not statistically significant.

harbored by the vector bearing PK sequences as described in the Materials and Methods and under the control of the same promoter), but rather to faster catabolic rates of PK mutants as was described previously (da Costa et al., 2009; Hampe et al., 2006). Therefore, we confirmed the above data in stably transfected HEK293 cells overexpressing wild-type, K161N-PK as well as another ubiquitin-ligase-deficient C441R-PK mutant. As was observed with transiently transfected cells (Fig. 2A–D), wild-type PK expression elicits an increase of DJ-1 expression ($+86.7 \pm 18.7\%$ of mock-transfected cells, Fig. 2E,F), promoter transactivation ($+123 \pm 19.3\%$ of mock-transfected cells, Fig. 2G) and mRNA levels ($+72 \pm 12.8\%$, Fig. 2H), the increments of which were fully prevented by both mutations (Fig. 2E–H). Overall, the above data indicate that PK-mediated control of DJ-1 is not cell specific, occurs in dopaminergic cells as well as *in vivo*, and remains unrelated to PK-associated ubiquitin ligase activity.

DJ-1 is controlled by p53

We recently documented a novel ubiquitin-ligase-independent function of PK that could act as a transcriptional repressor of the tumor suppressor p53 (da Costa et al., 2009). Since the control of DJ-1 by PK was also independent of its ubiquitin-ligase activity, we have examined whether PK could control DJ-1 via p53. To address this question, we first examined the putative ability of p53 to control DJ-1. We took advantage of two cell models in which

either *p19^{Arf}* or *p19^{Arf}* and *p53* genes had been invalidated. The depletion of *p19^{Arf}* allows the analysis of the involvement of p53 in cell death without interference with p53-associated contribution to cell cycle control (Weber et al., 2000). In Fig. 3, the comparison of *p19^{Arf}*^{−/−} (white bars) and *p19^{Arf}*^{−/−}*p53*^{−/−} (black bars) indicates that the depletion of endogenous p53 (compare lanes marked −) induces an increase of DJ-1 expression ($+43.7 \pm 13.6\%$ of control EV-transfected *p19^{Arf}*^{−/−} cells, Fig. 3A,B), promoter transactivation ($+149.3 \pm 37.4\%$, Fig. 3C) and mRNA levels ($+147 \pm 32\%$, Fig. 3D). Complementation of both *p19^{Arf}*^{−/−} and *p19^{Arf}*^{−/−}*p53*^{−/−} fibroblasts by *p53* cDNA transfection (lanes marked + in Fig. 3A–D) leads to a significant diminution of DJ-1 expression ($−30.8 \pm 3.7\%$ of control EV-transfected *p19^{Arf}*^{−/−} cells, and $−33.8 \pm 4.1\%$ of control EV-transfected *p19^{Arf}*^{−/−}*p53*^{−/−} cells, Fig. 3A,B), promoter transactivation ($−37.1 \pm 3.3\%$, and $−30.9 \pm 8.1\%$, Fig. 3C), and mRNA levels ($−53 \pm 2.1\%$, and $−57 \pm 7.4\%$, Fig. 3D). Interestingly, analysis of brain samples from age-matched mice in which the gene of *p53* has been invalidated (*p53*^{−/−}) or not (*p53*^{+/+}), indicates an increase of DJ-1 protein expression ($+95 \pm 8.9\%$ of control *p53*^{+/+} brains, Fig. 3E) and mRNA levels ($+27.6 \pm 9.3\%$, Fig. 3F).

In order to further confirm the influence of p53 on DJ-1, we took advantage of another cell system in which p53 expression was altered to examine DJ-1 expression. Thus, the human colorectal carcinoma cell line (HCT116-*p53*^{−/−}) is a *p53* knockout cell line derived from HCT116-*p53*^{+/+} by homologous recombination

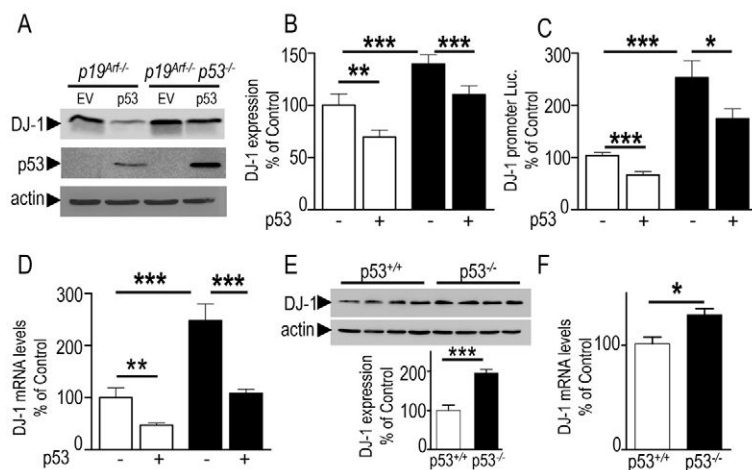


Fig. 3. Endogenous p53 modulates DJ-1 expression and mRNA levels *in vitro* and *in vivo*. (A–D) *p19^{Arf}*^{−/−} (white bars) and *p19^{Arf}*^{−/−}*p53*^{−/−} (black bars) mouse embryonic fibroblasts were transiently transfected with pcDNA3 empty vector (EV, bars marked −) or with *p53* cDNA (*p53*, bars marked +). Twenty-four hours after transfection, cells were examined for DJ-1, p53 and actin-like immunoreactivities (A,B), human DJ-1 promoter transactivation (C) and mRNA levels (D). Bars are the means $\pm$ s.e.m. of 3 or 4 independent experiments (each performed in 5 replicates) and are expressed as a percentage of control EV-transfected *p19^{Arf}*^{−/−} cells. Brain homogenates derived from *p53*^{+/+} and *p53*^{−/−} mice were analyzed for their DJ-1 and actin immunoreactivities (E) and *DJ-1* mRNA levels (F). Bars represent the means $\pm$ s.e.m. of 4–8 independent experiments and are expressed as a percentage of control *p53*^{+/+} brains. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

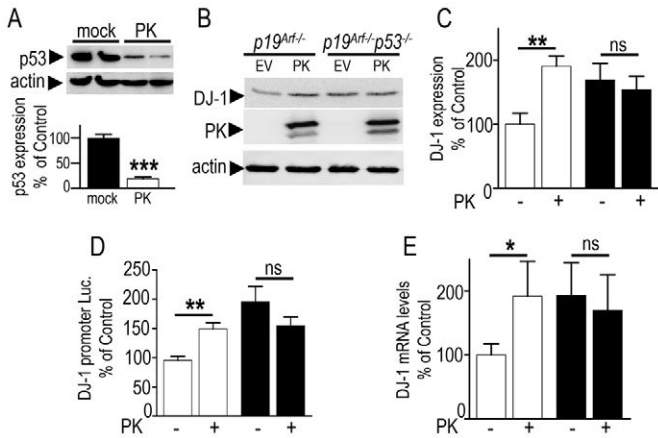


Fig. 4. Parkin-mediated regulation of DJ-1 is fully p53-dependent. (A) TSM1 neurons stably transfected with an empty vector (mock) or with wild-type *parkin* (PK) cDNA were examined for their p53- and actin-like immunoreactivities. Bars represent the densitometric analysis expressed as a percentage of control mock-transfected cells and are the means $\pm$ s.e.m. of 4 independent experiments. (B–E) *p19^{Arf}-/-* (white bars) and *p19^{Arf}-/-p53^{-/-}* (black bars) fibroblasts were transiently transfected with an empty vector (EV) or with wild-type *parkin* (PK) cDNAs. Twenty-four hours after transfection, cells were examined for DJ-1-, parkin- and actin-like immunoreactivities (B,C), human DJ-1 promoter transactivation (D) and mRNA levels (E). Bars indicate results as a percentage of control EV-transfected *p19^{Arf}-/-* cells and are the means $\pm$ s.e.m. of 4–11 independent experiments (6 replicates each). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ns, not statistically significant.

(Bunz et al., 1998). Interestingly, here again, we observed an upregulation of DJ-1 expression ($+49.1 \pm 12.7\%$ of HCT116-*p53^{+/+}* cells, supplementary material Fig. S2A) and promoter transactivation ($+116 \pm 13.8\%$ of control HCT116-*p53^{+/+}* cells, supplementary material Fig. S2B). The above set of data first excludes a cell-specific regulation of DJ-1 by p53 and clearly establishes that p53 downregulates DJ-1 protein expression and mRNA levels both *in vitro* and *in vivo*.

PK-mediated control of DJ-1 is p53-dependent

The above data showing the upregulation of DJ-1 by PK and its downregulation by p53, together with our previous demonstration that parkin transcriptionally repressed p53 (da Costa et al., 2009) led us to envision that PK-associated increase of DJ-1 expression could occur through PK-mediated repression of p53. As previously established (da Costa et al., 2009), stably transfected TSM1 neurons expressing wild-type PK exhibit drastically lower p53 expression ($-81 \pm 3\%$ of control mock-transfected neurons, Fig. 4A). Thus, we examined the contribution of p53 by assessing the influence of endogenous p53 depletion on PK-mediated increase of DJ-1. We first observed that *p19^{Arf}-/-* fibroblasts expressing *parkin* cDNA exhibit an increased DJ-1 expression [$+90.5 \pm 23\%$ of EV-transfected *p19^{Arf}-/-* cells (compare white bars), Fig. 4B,C], promoter transactivation ($+56 \pm 11\%$, Fig. 4D) and mRNA levels ($+91.9 \pm 57.7\%$, Fig. 4E). This shows that fibroblasts containing endogenous p53 respond to *parkin* cDNA transfection and exhibit expected PK-mediated augmentation of DJ-1. As expected from above-described data, we confirmed that *p19^{Arf}-/-p53^{-/-}* cells display increased DJ-1 expression, promoter transactivation and mRNA levels [Fig. 4B and

compare white and black bars marked (–) in Fig. 4C–E, respectively], and that they remained totally unaffected by *parkin* cDNA transfection [see Fig. 4B and compare black bars marked (+) and (–) in Fig. 4C–E]. This set of experiments demonstrates that parkin-mediated regulation of DJ-1 is abolished by p53 depletion and thus, fully dependent of p53.

DJ-1 transcription is controlled by ER stress via the transcription factor XBP-1

Based on our observation that p53 lowers DJ-1 promoter activity and mRNA levels (Fig. 3), and sticking with the well characterized function of p53 as a transcription factor, we have performed an *in silico* study to search for putative p53 consensus binding sites in the human DJ-1 promoter. We did not delineate any fully conserved consensus site recognized by p53. We identified some putative partially conserved sites that we have mutated. However, none of the mutations tested affected p53-mediated control of DJ-1 promoter transactivation (data not shown), meaning that an additional molecular intermediate in the cascade linking PK and DJ-1 remained to be identified.

Interestingly, we identified a highly conserved XBP-1 binding site motif close to the transcription start site of different DJ-1 promoter sequences including human (h.DJ-1) and mice (m.DJ-1) species (see Fig. 5A). XBP-1 is a well-characterized protein activated by the unfolded protein response (UPR or ER stress) (Yoshida et al., 2001). Therefore, we envisioned the possibility that XBP-1 could be the missing link of the cellular machinery functionally connecting PK and DJ-1. As a first attempt to study XBP-1 contribution to DJ-1 expression, we have first examined parkin, p53 and DJ-1 expressions responsiveness to an ER-stress. The treatment with a classical ER stress-inducer, thapsigargin (TPS), triggers an increase of parkin ($+151 \pm 24.2\%$ of control untreated cells, Fig. 5B) and DJ-1 protein levels ($+52 \pm 19\%$, Fig. 5C) as well as a reduction of the promoter activity of p53 ($-49 \pm 2.3\%$, supplementary material Fig. S3). These observations were fully in line with our hypothesis of an involvement of XBP-1 as a cellular intermediate between PK and DJ-1.

We have taken advantage of a cell model in which the *Xbp-1* gene has been genetically invalidated (see XBP-1 expression in *XBP-1^{-/-}* cells in supplementary material Fig. S4) to directly test the capability of XBP-1 to control DJ-1. XBP-1 depletion triggers a decrease of DJ-1 protein expression ($-87 \pm 0.6\%$ of control *XBP-1^{+/+}* cells, Fig. 5D), promoter transactivation ($-72 \pm 0.6\%$, Fig. 5E) and mRNA levels ($-76 \pm 3.3\%$, Fig. 5F). The depletion of XBP-1 by a siRNA approach confirmed the control of DJ-1 by XBP-1. Thus, two sets of siRNA (si1 and to a lesser extent, si2 siRNA, see supplementary material Fig. S4) that lower XBP-1 also reduce DJ-1 expressions by about 26%.

Data derived from *XBP-1* genetic manipulation experiments were further confirmed by a pharmacological approach. Thus, XBP-1 is activated by an unconventional mRNA splicing by the endonuclease IRE-1 α in response to ER stress (Yoshida et al., 2001). Recently, one compound (referred to as 4 μ 8C thereafter) aimed at blocking IRE1-mediated splicing of *XBP-1* and, as a consequence, interfering with XBP-1 function has been designed (Cross et al., 2012). As shown in supplementary material Fig. S5, TPS-induced cellular stress reveals a XBP-1 spliced-like immunoreactive protein (supplementary material Fig. S5A), the production of which is abolished in *XBP-1^{-/-}* cells and interestingly, totally prevented by 4 μ 8C in *XBP-1^{+/+}* cells (supplementary material Fig. S5A). It should be noted that

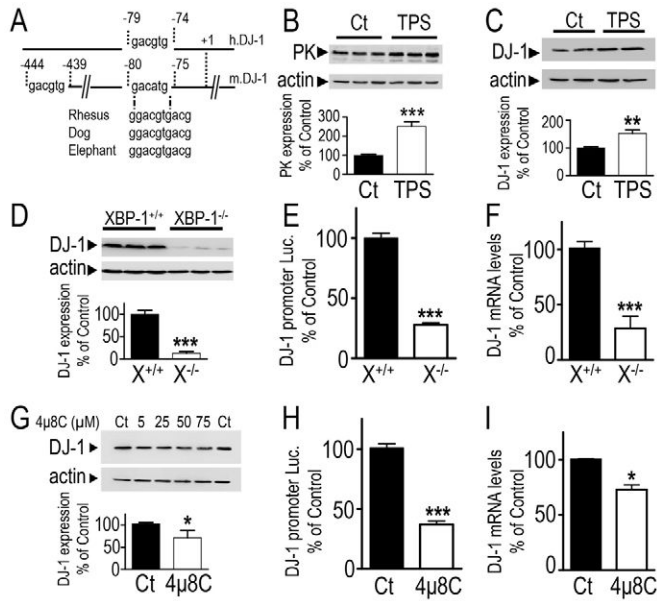


Fig. 5. ER stress-associated transcriptional regulation of DJ-1 by XBP-1. (A) Representation of DJ-1 promoter regions harboring potential XBP-1 binding sites. (B,C) SH-SY5Y cells were treated for 16 hours with thapsigargin (TPS, 1 μ M) or vehicle (DMSO) then harvested and analyzed for parkin (PK, B), DJ-1 (C) and actin (B,C) immunoreactivities. Bars correspond to densitometric analyses expressed as a percentage of control untreated cells (Ct) and are the means $\pm$ s.e.m. of 3 independent experiments performed in 3 replicates. (D–F) *XBP-1*^{+/+} (*X*^{+/+}, black bars) and *XBP-1*^{-/-} (*X*^{-/-}, white bars) mouse fibroblasts were analyzed for their DJ-1 expression (D), promoter transactivation (E) and mRNA (F) levels. Bars are expressed as a percentage of control *XBP-1*^{+/+}-treated cells and represent the means $\pm$ s.e.m. of 3 or 4 independent experiments performed in 3 or 4 replicates. (G–I) SH-SY5Y cells were treated with TPS (1 μ M, overnight, Ct) or with 4 μ 8C at the indicated concentrations (G) or with 50 μ M of the Ire-1 inhibitor 4 μ 8C (H,I). Then, DJ-1 expression (G), promoter transactivation (H) and mRNA levels (I) were analyzed. Bars express results as a percentage of control TPS-treated cells and represent means $\pm$ s.e.m. of 4–6 replicates. ** P <0.01, *** P <0.001 compared with controls.

4 μ 8C did not affect unspliced XBP-1 (XBP-1U) in basal conditions (supplementary material Fig. S5B, middle gel). However, 4 μ 8C abolishes TPS-induced specific *XBP-1* spliced transcript (supplementary material Fig. S5B, upper gel) and concomitantly, lowers the expression of *XBP-1* spliced mRNA levels (supplementary material Fig. S5C) and drastically reduces associated promoter auto-activation (Acosta-Alvear et al., 2007) (supplementary material Fig. S5D). Interestingly, 4 μ 8C also dose-dependently reduces DJ-1 protein expression (-31.6 ± 10.3 , Fig. 5G) and lowers DJ-1 promoter transactivation (-63.7 ± 4.5 , Fig. 5H) and mRNA levels (-27.5 ± 5.4 , Fig. 5I).

In order to definitely prove the direct transcriptional regulation of DJ-1 by XBP-1, we have mutated the human DJ-1 promoter consensus binding motif of XBP-1 and analyzed the effect of the overexpression of unspliced (transcriptionally inactive, XBP-1U) and spliced (transcriptionally active, XBP-1S) forms of XBP-1 on wild-type and mutated DJ-1 promoter activity in SH-SY5Y cells. It should be noted first that EV-transfected cells display lower transactivation of mutated promoter, indicating that an endogenous active form of XBP-1 that appears to control positively DJ-1 promoter transactivation, occurs in these cells (Fig. 6A, compare white bars). This agrees with the faint but

detectable spliced transcript observed in supplementary material Fig. S5B, upper gel, and the 4 μ 8C-sensitive XBP-1 mRNA auto-activation in basal conditions (not shown). As expected from above-described data, the spliced form (Fig. 6A, black bar, wt lane) but not the inactive form (Fig. 6A, gray bar, wt lane) of XBP-1 increased the transactivation of DJ-1 promoter ($+157 \pm 30.9\%$, $n=12$, $P<0.001$; Fig. 6A). Interestingly, the mutation disrupting the consensus binding site of XBP-1 completely abolished the responsiveness of the DJ-1 promoter to spliced XBP-1-mediated activation (Fig. 6A, compare black bars).

Finally, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments to determine if XBP-1 physically interacted with the mouse DJ-1 promoter. The motif corresponding to the XBP-1 consensus binding site is located at position -444 to -439 from the TSS of DJ-1 promoter (see Fig. 6B, upper scheme). We thus designed a couple of primers covering the region -444 and -439 to examine the interaction of endogenous XBP-1 with the mouse DJ-1 promoter. As indicated in Fig. 6B (lower panel), selective immunoprecipitation of XBP-1 leads to the

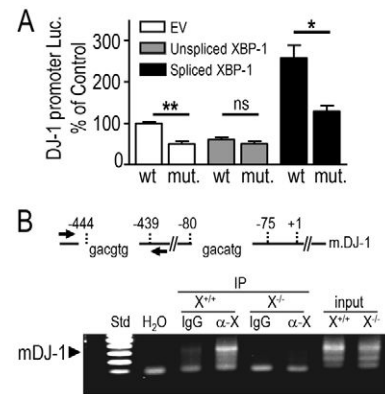


Fig. 6. XBP-1 physically interacts with DJ-1 promoter. (A) SH-SY5Y human neuroblastoma cells were transiently co-transfected with human wild-type (wt) or mutated (XBP-1 binding site deleted, mut) DJ-1-luciferase promoter construct and either empty vector (EV, white bars) or cDNAs encoding XBP-1U (gray bars) or XBP-1S (black bars). Data were normalized by additional transfection of a CMV- β galactosidase vector. Twenty-four hours after transfection, DJ-1 promoter transactivation was monitored as described in the Materials and Methods. Bars express results as a percentage of control EV and wild-type DJ-1 promoter co-transfected cells and are the means $\pm$ s.e.m. of 4 independent experiments performed in 3 replicates. (B) Top: Representation of mouse DJ-1 promoter region including the sequence and the position of two putative XBP-1 binding sites at positions -444 to -439 and -80 to -75 from the transcription start site (denoted +1). The two arrows indicate the approximate position of the primers used in the ChIP experiment on mouse fibroblasts. (B) Bottom: ChIP analysis of the interaction between endogenous mouse XBP-1 and mouse DJ-1 promoter in wild-type (*X*^{+/+}) and XBP-1-deficient (*X*^{-/-}) fibroblasts reveals a PCR product (300-nucleotides long) obtained with the mouse PCR primers covering the -565 to -266 region of the DJ-1 mouse promoter. α -X and IgG represent ChIP analyses carried out after immunoprecipitation with specific XBP-1 antibody (M-186; sc-7160) or with unrelated control antibodies. DNA inputs in *XBP-1*^{+/+} and *XBP-1*^{-/-} cells are indicated on the right-hand lanes. H₂O is a negative control in which the DNA is replaced by water. The left lane of the gel (Std) shows a portion (from 600 bp to 100 bp) of the 100 bp DNA Ladder from Promega (G2101). The gel presented here is representative of 3 independent experiments. * P <0.05, ** P <0.01; ns, not statistically significant.

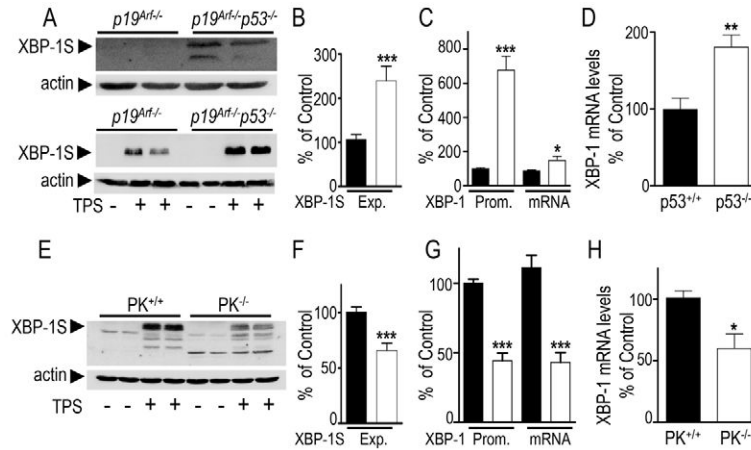


Fig. 7. Influence of endogenous p53 and parkin on XBP-1 expression. (A) Expression of endogenous XBP-1S in $p19^{Arf-/-}$ and $p19^{Arf-/-}p53^{-/-}$ cells in basal (top panel) or thapsigargin (TPS)-treated (1 μ M, 16 hours; lower panel) conditions. (B) Densitometric analysis of the XBP-1S-like immunoreactivity (Exp) in TPS-treated $p19^{Arf-/-}$ (black bars) and $p19^{Arf-/-}p53^{-/-}$ (white bars) cells (normalized by actin expression). Values are the means $\pm$ s.e.m. of 3 independent experiments performed in 2–3 replicates. (C) Mouse XBP-1 promoter transactivation (Prom) and mRNA levels were measured in $p19^{Arf-/-}$ (black bars) and $p19^{Arf-/-}p53^{-/-}$ (white bars) cells. Values are expressed as a percentage of control values obtained in $p19^{Arf-/-}$ cells and are the means $\pm$ s.e.m. of 3 independent experiments performed in 3 replicates. (D) *XBP-1* mRNA levels detected in brain samples derived from $p53^{+/+}$ and $p53^{-/-}$ mice measured by RT-PCR and expressed as a percentage of control $p53^{+/+}$ brains. Bars represent means $\pm$ s.e.m. of 4 or 5 brains. (E) Analysis of the expression of endogenous XBP-1 in $PK^{+/+}$ and $PK^{-/-}$ cells treated with TPS (1 μ M, 16 hours). (F) Densitometric analysis of the XBP-1S-like immunoreactivity (Exp) in TPS-treated $PK^{+/+}$ (black bars) and $PK^{-/-}$ (white bars) cells expressed as a percentage of control TPS-treated $PK^{+/+}$ cells. Values are the means $\pm$ s.e.m. of 5 independent experiments performed in 2–3 replicates. (G) Mouse XBP-1 promoter transactivation (Prom) and mRNA levels were measured in $PK^{+/+}$ (black bars) and $PK^{-/-}$ (white bars) cells. Values are expressed as a percentage of control values obtained in $PK^{+/+}$ cells and are the means $\pm$ s.e.m. of 3 or 4 independent experiments performed in 4 to 6 replicates. (H) Densitometric analysis of *XBP-1* mRNA levels detected in brain samples from $PK^{+/+}$ and $PK^{-/-}$ mice measured by RT-PCR. Results are expressed as a percentage of control $PK^{+/+}$ brains and are the means $\pm$ s.e.m. of 5 mouse brains of each. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

amplification of a specific DJ-1-associated fragment in *XBP-1*^{+/+} ($X^{+/+}$) cells (Fig. 6B, compare lanes IgG control versus α -X). This fragment was absent when the immunoprecipitation was performed in *XBP-1*^{-/-} ($X^{-/-}$) cells (Fig. 6B, compare lanes α -X in $X^{+/+}$ and $X^{-/-}$ cells). Overall, the above-data all concur to firmly support the view that endogenous XBP-1 directly and specifically interacts with, and upregulates DJ-1 promoter.

XBP-1 is controlled by p53 and parkin

In order to reconcile the fact that PK and p53 inversely modulate DJ-1 together with our observation that XBP-1 could upregulate DJ-1, we have further examined the ability of parkin and p53 to control XBP-1. First, we show that the overexpression of p53 in SH-SY5Y cells represses the transactivation of the XBP-1 promoter ($-41.6 \pm 4.5\%$, supplementary material Fig. S6). Conversely, p53 depletion leads to increased XBP-1S expression in both basal (Fig. 7A, compare lanes $p19^{Arf-/-}$ and $p19^{Arf-/-}p53^{-/-}$ in upper gel) and TPS-induced (Fig. 7B, compare lanes $p19^{Arf-/-}$ and $p19^{Arf-/-}p53^{-/-}$ in lower gel; $+133 \pm 34.1\%$ of control $p19^{Arf-/-}$ cells) conditions. Clearly, the lack of p53 also increases XBP-1 promoter transactivation ($+576 \pm 81.8\%$, Fig. 7C, Prom) and mRNA levels ($+61 \pm 24\%$, Fig. 7C). The regulation of XBP-1 promoter by p53 was confirmed in HCT116- $p53^{-/-}$ cells that also display higher XBP-1 promoter activity ($+32 \pm 6.4\%$ of control HCT116- $p53^{+/+}$ cells, supplementary material Fig. S2C). Finally, we have also established that the mRNA levels of *XBP-1* are increased in p53 knockout mice brains ($+80.8 \pm 22\%$ of control wild-type brains, Fig. 7D). Therefore, p53 behaves as a repressor of XBP-1 promoter transactivation in cells and *in vivo*.

In agreement with the above-described data, the invalidation of the *parkin* gene triggers a significant reduction of XBP-1S expression ($-31.9 \pm 3.6\%$ of control $PK^{+/+}$ cells, Fig. 7E,F), promoter transactivation ($-56 \pm 2.4\%$, Fig. 7G) and mRNA levels ($-68 \pm 3.3\%$, Fig. 7G). We have also demonstrated that mRNA levels of XBP-1 are lowered in PK-deficient mice brain ($-41 \pm 18\%$, Fig. 7H). The influence of PK on XBP-1S is therefore similar to the effect of PK on DJ-1. As a matter of fact, wild-type PK increases XBP-1 promoter transactivation ($+143.1 \pm 7\%$, supplementary material Fig. S7A) and mRNA levels ($+41.6 \pm 4.3\%$, supplementary material Fig. S7B). Interestingly, this phenotype was fully abolished by both ubiquitin-deficient and ubiquitin-active PK mutants.

In order to examine whether parkin-associated control of DJ-1 was fully dependent of XBP-1S, we pharmacologically blocked the activity of XBP-1S in cells devoid of endogenous parkin. We show that in both basal (Fig. 8A) and thapsigargin-treated (Fig. 8B) conditions, 4 μ 8C treatment triggers reduced DJ-1 expression ($-32.4 \pm 4.1\%$ and $-53.6 \pm 7.5\%$, respectively; Fig. 8, black bars) in wild-type but not in $PK^{-/-}$ cells. As expected, parkin depletion drastically reduces DJ-1 expression [$-69.7 \pm 3.3\%$ and $-85 \pm 4.7\%$; Fig. 8, compare black and empty bars labeled (-), respectively] the levels of which remained unaffected by 4 μ 8C (Fig. 8, open bars). Overall, this indicates that most of parkin-mediated control of DJ-1 indeed requires XBP-1.

Discussion

The etiology of PD is complex and several cellular dysfunctions appear to underlie the neurodegenerative process occurring in

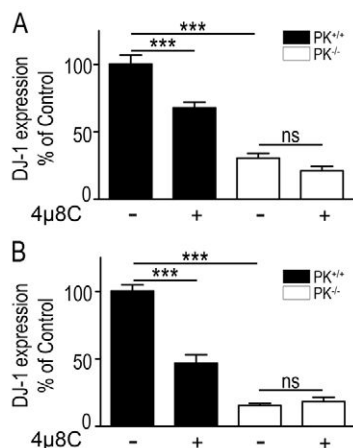


Fig. 8. Parkin-mediated control of DJ-1 is XBP-1 dependent. (A,B) MEF cells invalidated ($PK^{-/-}$) or not ($PK^{+/+}$) for the *parkin* gene were treated with vehicle (–) or with the IRE-1 inhibitor 4μ8C (+), in basal (A) and thapsigargin (B) conditions as described in Materials and Methods. Bars correspond to western blot analysis and quantification is expressed as a percentage of the DJ-1 expression in untreated wild-type fibroblasts. Values are the means $\pm$ s.e.m. of 12–15 replicates. *** $P < 0.001$; ns, not statistically significant.

this disease. Particularly significant is the observation of PD-related alterations of the ubiquitin-proteasome system that likely account for aberrant protein degradation and therefore, subsequent accumulation and aggregation as revealed by intracytoplasmic inclusions called Lewy bodies. Directly linked to these observations, the activation of the unfolded protein response (UPR) also called endoplasmic reticulum-stress (ER-stress) has been consistently documented in PD-related cellular model (Ryu et al., 2002) as well as in PD-affected brain (Hoozemans et al., 2007). Thus, this cellular response aims at regulating the overload of toxic abnormally folded proteins by inducing ER-resident chaperone proteins and by promoting their degradation (Ron and Walter, 2007). The latter process is therefore a key event and alterations of proteins or enzymes linked to ubiquitin-mediated proteasomal degradation are likely detrimental and central to PD development.

Parkin is a 52 kDa protein responsible for most of juvenile autosomal recessive forms (AR-JP) of PD. The structural features of this protein indicated that parkin could be involved in proteasomal degradation of ubiquitinated substrates. Thus, parkin harbors a N-terminal domain that displays homology with ubiquitin while its C-terminal moiety harbors RING motifs that are a structural hallmark generally exhibited by ubiquitin-ligases (Morett and Bork, 1999). Indeed, parkin has been characterized as an E3-ubiquitin ligase, the activity of which is abolished by mutations associated with AR-JP (Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000). Interestingly, the ability of parkin to prevent ER-stress has been linked to its capacity to trigger the degradation of a usually unfolded protein called Pael receptor (Imai et al., 2001). Parkin ubiquitinates Pael receptor in the ER and Pael receptor accumulates in AR-JP (Imai et al., 2001). Thus, parkin-associated control of the UPR could be linked to its enzymatic properties and it was proposed that its defect could account for selective dopaminergic neurons death. However, it is noteworthy that it was recently documented that parkin-associated protection

against ER-stress-induced cell death could be independent of the proteasomal machinery, indicating that parkin-related neuroprotection against ER-stress could not necessarily require its ubiquitin-ligase activity (Bouman et al., 2011). In this context, it is interesting that we recently documented an additional parkin-associated function as a transcription factor (da Costa et al., 2009). This agreed well with the preliminary description of a C-terminal IBR (In Between Ring) domain that indeed predicted a potential transcription factor activity for parkin (Morett and Bork, 1999). Thus, we established that parkin transrepressed the transcription of the pro-apoptotic tumor suppressor p53 and that this led to neuronal neuroprotection (da Costa et al., 2009). Whether this novel function could account for part of parkin-associated control of the UPR was therefore assessed.

Our study demonstrates that parkin controls the protein expression and promoter trans-activation of DJ-1, another protein which, when mutated, accounts for a subset of autosomal recessive cases of PD (Bonifati et al., 2003). By means of selective protein overexpression or gene inactivation *in vitro* and *in vivo*, we delineate a transcriptional cascade involving two intermediate transcription factors, namely p53 and the X-box-binding protein 1 (XBP-1). We establish that parkin represses p53 that acts as a repressor of XBP-1. Thereby, parkin activates XBP-1 that subsequently behaves as a strong transactivator of DJ-1 promoter transcription. We show that human and mouse DJ-1 harbors a putative XBP-1-targeted consensus sequence, the mutation of which abolishes XBP-1-mediated DJ-1 promoter transactivation and we document a physical interaction of XBP-1 with the human (data not shown) and mouse DJ-1 promoter by ChIP approach (Fig. 7B). Interestingly, interfering with any of the actors of this molecular cascade modulates parkin-associated control of DJ-1.

The present study unravels several novel cellular processes and has strong implications for ER-stress-mediated cell death in PD. First, this is the initial demonstration of a UPR-related functional link between parkin and DJ-1, two proteins involved in autosomal recessive cases of PD. It is very interesting to note that this control occurs besides the canonical ubiquitin-ligase activity of parkin. This agrees well with a recent study showing that parkin could control DJ-1 but failed to promote its ubiquitination (Moore et al., 2005a). Conversely, parkin appeared to trigger DJ-1 protein stabilization. Therefore, parkin could likely exert a dual control of DJ-1, either by directly interacting physically with the protein (Moore et al., 2005a) or indirectly functionally at a transcriptional level (present study).

The second important point of our study consists in the delineation of the mechanisms by which parkin protects against the UPR. Clearly, parkin triggers p53-mediated control of XBP-1, a protein involved in plasma cellular differentiation as well as in liver development (Sha et al., 2009). More related to PD, XBP-1 mRNA splicing/activation by the ER-resident endonuclease IRE1 is triggered by ER stress (Yoshida et al., 2001). Interestingly, the activation of XBP-1 indeed protects against several toxin-associated PD-related phenotypes in dopaminergic cells (Sado et al., 2009).

The demonstration that XBP-1 could directly transactivate DJ-1 promoter delineates a novel mechanism by which XBP-1 could interfere with ER-stress-associated cell death. Thus, XBP-1 was previously shown to regulate the mRNA levels of several ER chaperone proteins, the induction of which corresponds to one of the main response elicited by the UPR. Interestingly, DJ-1 has

been shown to protect against both oxidative and reticular stress (Taira et al., 2004; Yokota et al., 2003) via the control of oxidative stress associated genes, like *SOD* (Nishinaga et al., 2005), and key apoptotic mediators like p53 and Pten (Giaime et al., 2010; Kim et al., 2005) and to behave as a chaperone protein (Lee et al., 2003). Thus the present work also contributes to the understanding of one of the cellular responses leading to the enhancement of its chaperone, and thereby folding capacities, in response to ER-stress.

UPR is initially triggered by the binding of GRP78 to misfolded proteins. This leads to the release of PERK, a pancreatic ER kinase that, when freely recovered in the cells, is activated by homodimerization and catalytic auto-phosphorylation (Merksamer and Papa, 2010). Phospho-PERK then phosphorylates the initiation factor pEIF2 α that increases the transcription of ATF4 (Zhang and Kaufman, 2006). Interestingly, parkin was recently shown to be transcriptionally modulated by ATF4 (Bouman et al., 2011). Therefore, overall, our work identifies a cellular response to ER-stress implying a transcriptional cascade by which parkin-mediated p53-dependent activation of XBP-1 could prevent ER-stress-mediated cell death by increasing DJ-1 levels. Our demonstration that parkin-associated pathogenic mutations abolish the parkin-mediated effects on p53, XBP-1 and DJ-1 suggest that this cellular cascade could be altered in some cases of Parkinson's disease.

Materials and Methods

Cell systems and transfections

Telencephalon specific mouse 1 (TSM1), mouse embryonic fibroblasts (MEF), human colorectal adenocarcinoma (HCT116), human embryonic kidney 293 (HEK293) and SH-SY5Y human neuroblastoma cells were cultured in 5% CO₂, in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 μ g/ml). TSM1 neurons expressing empty vector or wild-type HA-tagged parkin were obtained as described (da Costa et al., 2003). HEK293 cells stably expressing wild-type or mutated parkin were obtained after jetPRIME agent transfection (Polyplus) and genetic selection for ten days. Immortalized mouse embryonic fibroblasts invalidated for the *parkin*, *XBP-1*, *p19^{arf}* and both *p19^{arf}* and *p53* genes and HCT116 have been generously provided by Drs T. Dawson, L. Glimsher, M. Roussel and B. Vogelstein. Transient transfection of SH-SY5Y, HEK293 were carried by means of either lipofectamine 2000 (Invitrogen) or jetPRIME reagent according to the manufacturer's instructions while parkin, *p19^{arf}*, *p19^{arf}*, *p53* fibroblasts were transfected by means of NucleofactorTM kit (Amaxa Biosystems) as previously described (Pardossi-Piquard et al., 2005).

Constructs and site-directed mutagenesis

The cDNA of human parkin has been cloned in the pIRES2-EGFP-NEO vector (Clontech). Wild-type human *DJ-1* and *p53* cDNAs were gifts from Dr P. Heutink, and M. Oren. Parkin mutagenesis was performed with the QuikChange II kit (Stratagene). 5'-end truncated mouse XBP-1 promoter-luciferase constructs have been generated from the mouse XBP-1 full-length promoter-luciferase used as a template in PCR reactions. Primers used for the obtention of the 581, 438, 285 and 138 nucleotides promoter fragments are described in supplementary material Table S2. These fragments were digested with *SacI* and *HindIII* and subcloned in the pGL3 basic vector (Promega). The deletion of the putative p53 binding site on the wild-type mouse XBP-1 promoter was achieved with the XBP-1 forward and reverse primers described in supplementary material Table S2.

The deletion of the XBP-1 binding site of hDJ-1 promoter was obtained by three PCR steps: the first one using the GLprimer1 forward primer and the human DJ-1 deleted of XBP-1 binding site reverse primer. The second fragment was obtained using the GLprimer2 reverse primer with the human DJ-1 deleted of XBP-1 binding site forward primer. The right size products of the two first PCR were combined and mixed, then 10 PCR cycles were performed, the GLprimer1 and GLprimer2 were added and 25 more cycles were realized. Finally the human DJ-1 promoter deleted for the XBP-1 binding site was cloned in the pGL2-basic vector (Promega).

The p53 and DJ-1 promoter-luciferase constructs have been previously described (Ginsberg et al., 1990; Taira et al., 2001). The unspliced and spliced mouse *XBP-1* cDNA in pDNA3-FLAG, the pGL3-mouse XBP-1 promoter-luciferase, and the four XBP-1 shRNA-pSuper-puro were from Dr L. Qi. shRNA (KD1, KD2 and SC) targeting human parkin have been engineered in our laboratory based on the published siRNA sequences (Veeriah et al., 2010) and

inserted in the pSuper-GFP-neo vector according to the manufacturer's instructions (Oligoengine). All the primers (Eurogentec) used are described in supplementary material Tables S1 and S2. All the constructs were verified by sequencing.

Western blot analysis

Cells were homogenized in lysis buffer (Tris-HCl, 10 mM; pH 7.5, containing NaCl (150 mM), Triton X-100 (0.5%), deoxycholate (0.5%) and EDTA (5 mM) and resolved on 12% SDS-PAGE gel and wet-transferred to Hybond-C (Amersham Life science) membranes. Immunoblottings were performed by means of the following antibodies: rabbit polyclonal anti-DJ-1 antibodies (MAB18257, Abcam), mouse monoclonal anti-parkin antibodies (MAB5512, Abcam), mouse monoclonal anti-p53 antibodies (Santa-Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-GFP antibodies (Roche Applied Science), anti-XBP-1 antibodies (M-186, Santa-Cruz Biotechnology) or mouse monoclonal anti-actin antibodies (Sigma). Protein immunoreactivities were revealed with either an anti-rabbit peroxidase or an anti-mouse peroxidase (Jackson ImmunoResearch) by electrochemoluminescence method (Roche Diagnostics S.A.S.). Chemiluminescence was recorded using a luminescence image analyzer LAS-3000 (Raytest), and quantification of images was performed using the FUJI FILM Multi Gauge image analyzer software.

DJ-1, p53 and XBP-1 promoter transactivations

The transcriptional activations of the human DJ-1, human p53 and mouse XBP-1 promoters in frame with luciferase (provided by Dr H. Ariga; Dr M. Oren and Dr L. Qi, respectively) were measured after co-transfection of β -galactosidase cDNA, in order to normalize transfection efficiencies (Promega). The protocol has been previously described (da Costa et al., 2003).

Real-time quantitative PCR

Total RNA from cells and mice brains were respectively extracted using the Nucleospin RNAII kit and RNeasy Lipid Tissue kit following instructions of the manufacturer (Macherey-Nagel GmbH and Qiagen, respectively). After treatment with DNase I, total RNA (2 μ g) were reverse-transcribed with AMV-transcriptase (Promega, Madison, WI) using oligo-dT priming. Real-time PCR were performed in the Light Cycler 480 (Roche) or Rotor-Gene6000 (Qiagen), using the SYBR Green detection protocol recommended by the manufacturer. Specific-gene primers were designed by means of the Universal Probe Library Assay Design Center software (Roche Applied Science). Relative expression levels of mouse and human *DJ-1* mRNA were normalized with mouse γ -actin and human *GAPDH* genes while mouse and human *Top1* gene were used to normalize for RNA concentration the relative expression levels of mouse and human *XBP-1* gene. All primers are described in supplementary material Table S3.

Semi-quantitative RT-PCR

Two μ g of total RNA were reverse transcribed and 1/40 of the resulting cDNA was then used as a template for semi-quantitative PCR. In each case, we checked that the PCR reaction was in the linear phase of the amplification. Based on primers already reported to detect mouse XBP-1 spliced isoform (Acosta-Alvear et al., 2007), we have designed primers capable of specifically amplifying the spliced form of human XBP-1. To amplify both isoforms of human XBP-1, we designed primers according to what had been already described for mouse XBP-1 (Iwakaki et al., 2004). Primers are described in supplementary material Table S3. The same primers were used in our quantitative PCR experiments.

Chromatin immunoprecipitation assay

Wild-type and knockout XBP-1 MEF cells were seeded in three 150-mm dishes and allowed to reach 70–80% confluence. Cells were fixed with formaldehyde, cross-linked and processed for chromatin preparation according to the manufacturer's recommendations. DNA was digested with the shearing enzyme provided in the kit, yielding chromatin fragments of about 200–500 bp in size. Each chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was performed on 50 μ l of chromatin in the ChIP immunoprecipitation buffer supplied and incubated overnight with 2 μ g of anti-XBP-1 M-186 antibody (Santa Cruz Biotechnology) or with irrelevant antibodies as negative controls. Immune complexes were then incubated (1.5 hours at 4°C) with 100 μ l of a solution of protein G-Sepharose. After elution of the immune complexes, cross-links were reversed and RNA digested using RNase (100 mg/ml). To eliminate proteins, proteinase K (100 mg/ml) was added and the samples were incubated for 2 hours at 42°C. DNA was purified on columns provided in the kit and PCR amplifications were performed using primers specific for the -444/-439 bp region of the mouse DJ-1 promoter (forward primer: 5'-GGATGCTGGGAACCGAACCTGGGTC-3' and reverse primer: 5'-CTGGGCTACAGCCTGAACCCACAC-3').

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) by using either the unpaired Student's *t*-test for pairwise comparison or Newmann-Keuls multiple comparison tests for one-way ANOVA

analysis of variance. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not statistically significant.

Acknowledgements

Drs B. Vogelstein, M. Roussel, L. Glimcher, J. Shen T. and Dawson are warmly thanked for providing us with the p53, XBP-1 and parkin knockout cells, respectively. Drs M. Oren and P. Heutink are thanked for providing us the p53 and DJ-1 constructs, respectively. Dr J.C. Bourdon is warmly thanked for providing p53 antibodies. Dr D. Ron is thanked for the Ire-1 α inhibitor (4 μ 8C).

Author contributions

E.D., E.G., J.V. and J.S. performed the experiments. O.C., A.B., H.A. and L.Q. provided materials and corrected the writing. E.D., F.C. and C.A.d.C. designed the experiments, discussed the data and wrote the paper.

Funding

J.V. is supported by the Association Monégasque pour la recherche contre la Maladie d'Alzheimer and E.D. is funded by the Fondation pour la Recherche Médicale. This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale and by the Conseil Général des Alpes Maritimes. This work has been developed and supported through LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) and DISTALZ (development of innovative strategies for a transdisciplinary approach to Alzheimer's disease).

Supplementary material available online at

<http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.127340/-DC1>

References

- Abbas, N., Lücking, C. B., Ricard, S., Dürr, A., Bonifati, V., De Michele, G., Bouley, S., Vaughan, J. R., Gasser, T., Marconi, R. et al. (2005). French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (1999). A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 567-574.
- Abou-Sleiman, P. M., Healy, D. G., Quinn, N., Lees, A. J. and Wood, N. W. (2003). The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **54**, 283-286.
- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y. and Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell* **27**, 53-66.
- Bandopadhyay, R., Kingsbury, A. E., Cookson, M. R., Reid, A. R., Evans, I. M., Hope, A. D., Pittman, A. M., Lashley, T., Canet-Aviles, R., Miller, D. W. et al. (2004). The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease. *Brain* **127**, 420-430.
- Bertoli-Avella, A. M., Giroud-Benitez, J. L., Akyol, A., Barbosa, E., Schaap, O., van der Linde, H. C., Martignoni, E., Lopiano, L., Lamberti, P., Fincati, E. et al. (2004). Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **20**, 424-431.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C., Squitieri, F., Ibanez, P., Jooze, M. et al. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* **299**, 256-259.
- Bouman, L., Schlierf, A., Lutz, A. K., Shan, J., Deinlein, A., Kast, J., Galehdar, Z., Palmisano, V., Patenge, N., Berg, D. et al. (2011). Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ.* **18**, 769-782.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501.
- Cross, B. C., Bond, P. J., Sadowski, P. G., Jha, B. K., Zak, J., Goodman, J. M., Silverman, R. H., Neubert, T. A., Baxendale, I. R., Ron, D. et al. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, E869-E878.
- da Costa, C. A., Masliah, E. and Checler, F. (2003). β -synuclein displays an antiapoptotic p53-dependent phenotype and protects neurons from 6-hydroxydopamine-induced caspase 3 activation: cross-talk with alpha-synuclein and implication for Parkinson's disease. *J. Biol. Chem.* **278**, 37330-37335.
- da Costa, C. A., Sunyach, C., Giaime, E., West, A., Corti, O., Brice, A., Safe, S., Abou-Sleiman, P. M., Wood, N. W., Takahashi, H. et al. (2009). Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1370-1375.
- Dodson, M. W. and Guo, M. (2007). Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 331-337.
- Giaime, E., Sunyach, C., Druon, C., Scarzello, S., Robert, G., Grosso, S., Auberger, P., Goldberg, M. S., Shen, J., Heutink, P. et al. (2010). Loss of function of DJ-1 triggered by Parkinson's disease-associated mutation is due to proteolytic resistance to caspase-6. *Cell Death Differ.* **17**, 158-169.
- Ginsberg, D., Oren, M., Yaniv, M. and Piette, J. (1990). Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene* **5**, 1285-1290.
- Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A. and Corti, O. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2059-2075.
- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., de Vos, R. A., Rozemuller, J. M. and Scheper, W. (2007). Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 707-711.
- Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. and Takahashi, R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* **105**, 891-902.
- Itier, J.-M., Ibanez, P., Mena, M. A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G. A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L. et al. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2277-2291.
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K. and Miura, M. (2004). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* **10**, 98-102.
- Kim, R. H., Peters, M., Jang, Y., Shi, W., Pintilie, M., Fletcher, G. C., DeLuca, C., Liepa, J., Zhou, L., Snow, B. et al. (2005). DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer. Cell* **7**, 263-273.
- Lee, S. J., Kim, S. J., Kim, I. K., Ko, J., Jeong, C. S., Kim, G. H., Park, C., Kang, S. O., Suh, P. G., Lee, H. S. et al. (2003). Crystal structures of human DJ-1 and Escherichia coli Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 44552-44559.
- Merksamer, P. I. and Papa, F. R. (2010). The UPR and cell fate at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 1003-1006.
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (2005a). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**, 57-87.
- Moore, D. J., Zhang, L., Troncoso, J., Lee, M. K., Hattori, N., Mizuno, Y., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (2005b). Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 71-84.
- Moretto, E. and Bork, P. (1999). A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 229-231.
- Nishinaga, H., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Andreadis, A., Iguchi-Ariga, S. M. and Ariga, H. (2005). Expression profiles of genes in DJ-1-knockdown and L 166 P DJ-1 mutant cells. *Neurosci. Lett.* **390**, 54-59.
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Müller, U. et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* **46**, 541-554.
- Ron, D. and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519-529.
- Ryu, E. J., Harding, H. P., Angelastro, J. M., Vitolo, O. V., Ron, D. and Greene, L. A. (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **22**, 10690-10698.
- Sado, M., Yamasaki, Y., Iwanaga, T., Onaka, Y., Ibuki, T., Nishihara, S., Mizuguchi, H., Momota, H., Kishibuchi, R., Hashimoto, T. et al. (2009). Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1. *Brain Res.* **1257**, 16-24.
- Sha, H., He, Y., Chen, H., Wang, C., Zenno, A., Shi, H., Yang, X., Zhang, X. and Qi, L. (2009). The IRE1alpha-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab.* **9**, 556-564.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* **25**, 302-305.
- Shulman, J. M., De Jager, P. L. and Feany, M. B. (2011). Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 193-222.
- Taira, T., Takahashi, K., Kitagawa, R., Iguchi-Ariga, S. M. and Ariga, H. (2001). Molecular cloning of human and mouse DJ-1 genes and identification of Sp1-dependent activation of the human DJ-1 promoter. *Gene* **263**, 285-292.
- Taira, T., Saito, Y., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. M., Takahashi, K. and Ariga, H. (2004). DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep.* **5**, 213-218.
- Takahashi, R., Imai, Y., Hattori, N. and Mizuno, Y. (2003). Parkin and endoplasmic reticulum stress. *Ann. New York Acad. Sci.* **991**, 101-106.
- Tanaka, K., Suzuki, T., Chiba, T., Shimura, H., Hattori, N. and Mizuno, Y. (2001). Parkin is linked to the ubiquitin pathway. *J. Mol. Med.* **79**, 482-494.
- Thomas, K. J., McCoy, M. K., Blackinton, J., Beilina, A., van der Brug, M., Sandebring, A., Miller, D., Maric, D., Cedazo-Minguez, A. and Cookson, M. R. (2011). DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 40-50.
- Veeriah, S., Taylor, B. S., Meng, S., Fang, F., Yilmaz, E., Vivanco, I., Janakiraman, M., Schultz, N., Hanrahan, A. J., Pao, W. et al. (2010). Somatic mutations of the

- Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. *Nat. Genet.* **42**, 77-82.
- Weber, J. D., Jeffers, J. R., Rehg, J. E., Randle, D. H., Lozano, G., Roussel, M. F., Sherr, C. J. and Zambetti, G. P. (2000). p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev.* **14**, 2358-2365.
- West, A., Periquet, M., Lincoln, S., Lücking, C. B., Nicholl, D., Bonifati, V., Rawal, N., Gasser, T., Lohmann, E., Deleuze, J. F. et al.; French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility on Parkinson's Disease (2002). Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease. *Am. J. Med. Genet.* **114**, 584-591.
- Yokota, T., Sugawara, K., Ito, K., Takahashi, R., Ariga, H. and Mizusawa, H. (2003). Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1342-1348.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T. and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891.
- Zhang, K. and Kaufman, R. J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* **66** Suppl. 1, S102-S109.
- Zhang, Y., Gao, J., Chung, K. K., Huang, H., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (2000). Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13354-13359.

La parkine et DJ-1 sont deux protéines liées aux formes autosomales récessives de la maladie de Parkinson.

DJ-1 est une protéine qui semble principalement servir de senseur du stress oxydatif. Le stress oxydatif est un des mécanismes physiopathologiques clés dans la pathologie, qui conduit à des dysfonctions mitochondriales, un stress protéolytique et une apoptose accrue, ce qui explique la mort des neurones. Les rôles de DJ-1 sont encore mal définis, et les mécanismes de contrôle de son expression le sont encore plus.

La parkine est quant à elle une protéine de la famille des protéines à doigt de zinc qui agit aussi bien comme une E3 ligase dans la voie de dégradation ubiquitine/protéasome que comme un facteur de transcription.

La parkine est connue pour interagir avec DJ-1 [72] mais ne semble pas promouvoir sa dégradation. Le mécanisme exact derrière cette régulation est encore inconnu.

Toutefois ces deux protéines sont liées au contrôle des protéines mal repliées et semblent actives en cas de stress du réticulum.

L'objectif est donc de comprendre le dialogue fonctionnel entre la parkine et DJ-1 en condition de stress.

La parkine contrôle DJ-1 dans les cellules et les cerveaux de souris.

La surexpression stable de la parkine dans des cellules de souris TSM1 (telencephalic specific murine 1) entraîne une augmentation de l'expression de DJ-1. Cette augmentation est retrouvée également au niveau du niveau d'ARNm et au niveau de l'activation du promoteur. Ces résultats ont été confirmés dans des modèles cellulaires invalidés pour la parkine et également par une approche d'ARN interférant.

Les mutants de la parkine abolissent son effet sur DJ-1.

Nous avons utilisé ici des mutants 161 et 418 de la parkine associés à la maladie de Parkinson. Ces mutants ainsi que la forme sauvage de la parkine ont été exprimés dans des lignées de neuroblastomes humains (SH-SY5Y). Nous observons que la diminution de l'expression de DJ-1, du niveau de son ARNm et de l'activité de son promoteur sont abolies par l'utilisation des mutants de la parkine. Ces résultats sont confirmés par la même approche réalisée dans un autre modèle cellulaire, les HEK 293 (Human Epithelial Kidney).

Ces deux mutations n'ont pas le même effet puisque la 161 conserve l'activité ubiquitine ligase alors que la 418 est connue pour l'abolir. Or dans les deux cas, l'effet de la parkine est aboli, ce qui suggère un mécanisme indépendant de la fonction ubiquitine/ligase.

DJ-1 est contrôlé par p53.

L'activité ubiquitine/ligase n'étant pas impliqué dans cette régulation, nous nous sommes intéressés à la seconde fonction de la parkine : facteur de transcription, p53 étant une cible connue de la parkine. Pour cela nous avons utilisé deux lignées de cellules MEF invalidées en p53. L'invalidation de p53 entraîne une augmentation de l'expression de DJ-1 au niveau protéique, de l'ARNm, et de l'activité du promoteur. La complémentation en p53 a pour effet d'annuler ces effets et de diminuer l'expression de DJ-1. Nos résultats ont été confirmés dans un autre modèle de cellules présentant une invalidation naturelle de p53. Il s'agit des cellules HCT116. Ces résultats suggèrent que l'expression de DJ-1 est sous le contrôle de p53

Le contrôle de DJ-1 par la parkine dépend de p53.

Pour vérifier la contribution de p53 dans la régulation de la parkine nous avons utilisé les mêmes cellules que précédemment.

Nous avons transfecté la parkine dans le modèle de cellules invalidées pour p53. Il apparaît que cette transfection entraîne une augmentation de l'expression de DJ-1 dans les cellules possédant du p53, mais n'a pas d'effet dans les cellules invalidées pour p53. Cette augmentation est observée également au niveau du taux d'ARNm et au niveau de l'activité du promoteur. Ces résultats montrent le rôle d'intermédiaire de p53 dans la régulation de DJ-1 par la parkine.

DJ-1 est contrôlée par le stress du réticulum via le facteur de transcription XBP-1.

Nos précédents résultats montrant le rôle de p53 dans le contrôle de la transcription de DJ-1 nous avons cherché sur le promoteur de DJ-1 des sites consensus de fixation de p53. Une étude *in silico* nous a montré qu'il n'y a pas de site fonctionnel de p53 sur ce promoteur. La mutagenèse des quelques sites partiels trouvés s'est révélé inefficace. Par contre nous avons trouvé un site de fixation pour XBP-1 aussi bien sur le promoteur de DJ-1 humain que murin. XBP-1 est un facteur de transcription qui est un élément de réponse au stress du réticulum [326]. Son activation est dépendante d'un épissage de l'ARN par une endonucléase IRE-1 α [326].

Pour évaluer la contribution de XBP-1 nous avons utilisé la thapsigargine et mesuré l'expression de DJ-1, de la parkine et de p53. Elle induit une augmentation de DJ-1 et de la parkine ainsi qu'une diminution de la transactivation de p53.

Nous avons ensuite utilisé un modèle de cellules invalidées pour XBP-1. Dans ces cellules l'expression de DJ-1 est diminuée au niveau protéique, de l'ARNm et de l'activité du promoteur. Les mêmes résultats sont observés en utilisant des siRNA dirigés contre XBP-1. Nous avons utilisé un composé, le 4 μ 8C pour inhiber IRE-1 α et ainsi bloquer l'action de XBP-1 [327]. L'utilisation de cette drogue entraîne une diminution de l'expression de DJ-1 ainsi que de son ARNm et de l'activité de son promoteur. XBP-1 actif est donc nécessaire pour réguler DJ-1.

Nous avons alors réalisé la mutagenèse du site de fixation d'XBP-1 sur DJ-1. Cette mutation entraîne la perte des effets précédemment observés. Pour confirmer ce résultat nous avons réalisé une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIPs). Cela confirme l'interaction entre XBP-1 et le promoteur de DJ-1.

XBP-1 est contrôlé par la parkine et p53.

Enfin, nous avons regardé l'effet de la parkine et de p53 sur l'expression de DJ-1.

L'invalidation de p53 entraîne une augmentation de l'expression de XBP-1 mais aussi de son niveau d'ARNm et de l'activité de son promoteur, que ce soit en condition basale ou traitée à la thapsigargine. Cette augmentation de l'expression de l'ARNm est d'ailleurs retrouvée dans des cerveaux de souris invalidées pour p53. p53 exerce donc un effet répresseur sur XBP-1.

L'invalidation de la parkine dans des cellules MEF conduit quant à elle à une diminution des niveaux protéiques, d'ARNm et d'activité du promoteur de XBP-1. Ces résultats sont confirmés dans des cerveaux de souris invalidées pour la parkine. L'utilisation des mutants de la parkine 161 et 418 conduit à la perte de cet effet. Enfin, l'inhibition pharmacologique d'XBP-1 dans les cellules invalidées ou non pour la parkine induit une baisse des niveaux protéiques et d'ARNm de DJ-1 dans les cellules possédant la parkine mais n'a pas d'effet dans celles invalidées pour la parkine. Ceci confirme que le contrôle de DJ-1 par la parkine requiert XBP-1.

Conclusion.

Dans cet article nous avons caractérisé une nouvelle voie de signalisation qui implique la parkine, p53, XBP-1 et DJ-1 en condition de stress réticulaire. La parkine inhibe p53 qui exerce une action inhibitrice sur XBP-1 qui est un activateur de DJ-1. En condition de stress réticulaire, l'augmentation de l'expression de la parkine exerce donc un effet activateur indirect sur l'expression de DJ-1.

Contribution personnelle à ce projet.

Pour ce projet, je me suis occupé de l'étude de l'effet des mutants de la parkine sur le contrôle de DJ-1. J'ai mis en évidence que les mutants 161 et 418 abolissent cette régulation, ce qui suggère un mécanisme indépendant de l'activité ubiquitine ligase (Figure 2, tableaux A, B, C et D). J'ai également réalisé des expériences dans des cellules invalidées pour p53 afin de mettre en évidence la contribution de cette protéine dans le contrôle de DJ-1 (Figure 3, tableaux A, B, C et D et figure 4 tableau E). J'ai enfin participé aux expériences sur les cerveaux de souris invalidées en parkine, en prélevant et en préparant les échantillons, et en réalisant certaines des expériences d'immunoempreintes (figure 1, tableau G).

Article 3

Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity

Julien Viotti, Eric Duplan, Céline Caillava, Joris Condat, Thomas Goiran, Cécile Giordano, Y Marie, A Idbah, Jean-Yves Delattre, Jérôme Honnorat, Frédéric Checler et Cristine Alves da Costa

ORIGINAL ARTICLE

Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity

J Viotti¹, E Duplan¹, C Caillava¹, J Condat¹, T Goiran¹, C Giordano¹, Y Marie², A Idbaih², J-Y Delattre², J Honnorat^{3,4,5}, F Checler¹ and C Alves da Costa¹

Gliomas represent the most frequent form of primary brain tumors in adults, the prognosis of which remains extremely poor. Inactivating mutations on the tumor suppressor *TP53* were proposed as a key etiological trigger of glioma development. p53 has been recently identified as a transcriptional target of parkin. Interestingly, somatic mutations on parkin have also been linked to glioma genesis. We examined the possibility that a disruption of a functional interaction between p53 and parkin could contribute to glioma development in samples devoid of somatic parkin mutations or genetic allele deletion. We show here that parkin levels inversely correlate to brain tumor grade and p53 levels in oligodendrogliomas, mixed gliomas and glioblastomas. We demonstrate that p53 levels negatively and positively correlate to bax and Bcl2 respectively, underlying a loss of p53 transcriptional activity in all types of glial tumors. Using various cell models lacking p53 or harboring either transcriptionally inactive or dominant negative p53, as well as in p53 knockout mice brain, we establish that p53 controls parkin promoter transactivation, mRNA and protein levels. Furthermore, we document an increase of parkin expression in mice brain after p53-bearing viral infection. Finally, both cancer-related p53 inactivating mutations and deletion of a consensus p53 binding sequence located on parkin promoter abolish p53-mediated control of parkin transcription, demonstrating that p53 regulates parkin transcription via its DNA binding properties. In conclusion, our work delineates a functional interplay between mutated p53 and parkin in glioma genesis that is disrupted by cancer-linked pathogenic mutations. It also allows envisioning parkin as a novel biomarker of glioma biopsies enabling to follow the progression of this type of cancers.

Oncogene advance online publication, 6 May 2013; doi:10.1038/onc.2013.124

Keywords: human brain glioma; glioblastoma cells; tumor grade; parkin; p53; transcription

INTRODUCTION

Gliomas accounts for a major therapeutic problem in neuro-oncology. They correspond to a large and heterogeneous variety of human brain tumors in which astrocytomas, regardless the grade of malignancy, are the more frequent forms, while oligodendrogliomas (OD) represent about 15 percent of glioma cases. The annual age-standardized incidence of primary malignant brain tumors is between ~2.6–7 per 100 000 habitants worldwide.¹ Except some rare cases of radiotherapy-induced gliomas and mutation-associated Li-Fraumeni and Turcot diseases, their etiologies remain largely unknown.

Cell transformation is a result of a deregulation of normal proliferation, differentiation and apoptosis. Accordingly, a general characteristic shared by tumor cells concerns both loss of normal cell cycle control and disability to elicit cell death processes. Interestingly, the tumor suppressor p53 protein, when activated, blocks cell cycle and turns on programmed cell death pathway in order to force damaged cells to commit suicide.² Thus, p53, referred to as the ‘guardian of the genome’, is a crucial protector against tumor development.^{3–5} This is supported by the widely

reported observations that human cancers frequently harbor *TP53* mutations inactivating its transcriptional activity⁶ and by the fact that p53 has a key role in the initiation and progression of diffuse gliomas.^{7–10} It is therefore of utmost importance to elucidate the molecular cascades triggered by p53, and more particularly, to identify its downstream targets in order to delineate cancer-associated dysfunctions taking place during gliomas development.

Parkin has been proposed as an additional tumor suppressor and its levels are drastically lowered in various tumors.^{11–15} These mutations lead to mitotic instability and abolishment of its canonical E3 ubiquitin-ligase activity.¹⁶

It is noteworthy that besides its well-documented ubiquitin-ligase activity, we recently documented a new function of parkin as a transcriptional repressor of p53.¹⁷ Thus, we established that parkin physically interacted with the *TP53* promoter and that germline parkin mutations fully abolished parkin-mediated trans-repression of p53.¹⁷ This set of data highlighted the possible molecular link between parkin expression, p53 control and tumorigenicity. We therefore questioned whether p53 could

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275 CNRS/UNSA, team labeled ‘Fondation pour la Recherche Médicale’ and ‘Laboratory of Excellence (LABEX) Distal’, Valbonne, France; ²AP-HP, Service de Neurologie 2-Mazarin, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Pierre & Marie Curie Paris VI, Centre de Recherche de l’Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, UMRs 975, Paris, France; ³Centre de référence des maladies rares ‘syndromes neurologiques paranéoplasiques’, hospices civils de Lyon, hôpital neurologique, Lyon, France; ⁴Inserm U1028/CNRS UMR 5292, centre de recherche en neurosciences de Lyon, Lyon, France and ⁵Université de Lyon, Université Claude-Bernard Lyon-1, Lyon, France. Correspondence: Dr F Checler or Dr C Alves da Costa, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR7275 CNRS/UNSA, team labeled ‘Fondation pour la Recherche Médicale’ and ‘Laboratory of Excellence (LABEX) Distal’, Valbonne, PACA 06560, France.

E-mail: checler@ipmc.cnrs.fr or acostada@ipmc.cnrs.fr

Received 18 July 2012; revised 13 February 2013; accepted 18 February 2013

control parkin expression and activity as part of a feed-back mechanism contributing to parkin-p53 homeostatic equilibrium and whether it could be altered in a pathological context.

We examined whether the loss of p53 transcriptional function triggered by cancer-related mutations, a common feature observed in tumors,¹⁸ could alter parkin levels and, account at least partly for glioma development and aggravation. First, we analyzed the status of the expression of parkin and p53 in distinct types of brain tumors displaying various severity grades and we observed a clear inverse correlation between tumor grades and parkin levels, as well as an inverse relationship between parkin and p53. Second, we have investigated the molecular interplay between parkin and p53 in glioma and non-glioma cellular models harboring inactive, dominant negative or mutated p53, as well as in p53 knockout cells and mice brains. We demonstrate that decreased parkin promoter transactivation and protein levels result from loss of function of p53 transcriptional activity. Overall, our study unravels a feed-back mechanism involving a positive control of parkin by p53 that is impaired by p53 mutations, and thereby leads to decreased parkin expression and activity levels in such a pathological context. This functional interplay between parkin and p53 could contribute to glioma genesis and identifies parkin expression as a putative additional marker of progression in these types of brain cancers.

RESULTS

Parkin levels inversely correlate with tumor grade and p53 expression in brain tumors of distinct cell type origin

We examined putative variations of parkin levels in pure OD and in oligoastrocytomas (OA, corresponding to mixed gliomas) harboring different severity grades from combined cohorts 1 and 2 (see Materials and methods). Figure 1 shows that parkin expression is reduced in grade II OD and that this reduction is even exacerbated in OD grade III (Figure 1a). Interestingly, parkin levels are also dramatically reduced in OA grades II and III (Figure 1d). Statistical analyses indicate a negative correlation between tumor grade and parkin protein levels in both cases (ANOVA, linear trend post-test, $R^2=0.561$, $P<0.0001$ for OD and $R^2=0.492$, $P<0.0001$ for OA). Analysis of p53-like immunoreactivity in the same tumor samples (Figures 1b and e) reveals an augmentation of p53 levels according to tumor grade in OD (Figure 1b, ANOVA, linear trend post-test, $R^2=0.384$, $P<0.0001$) and OA (Figure 1e, ANOVA, linear trend post-test, $R^2=0.091$, $P<0.05$). Of most interest, Figures 1c and f shows that there exists an inverse correlation between parkin and p53 protein levels according to tumor grades in both OD (Pearson R of -0.506 , $P<0.01$, Figure 1c) and OA (Pearson R of -0.441 , $P<0.01$, Figure 1f). Moreover, analysis of glioblastoma-derived samples (grade IV) indicates either a dramatic decrease of both parkin protein (-85.3 ± 8.2 , $P<0.0001$, Figure 1g) and mRNA levels (-86.3 ± 16.3 , $P<0.0001$, Figure 1h) that is accompanied by an increase of p53 expression ($+125.9 \pm 35.2$, $P<0.01$, Figure 1i). It should be highlighted that in order to rule out any artifact that would arise from biological samples variability or grades evaluation of biopsies; we have examined the status of parkin and p53 proteins in cohorts 1 and 2 independently. Although the number of cases in cohort 2 was smaller, data analysis of the two cohorts fully corroborate the results obtained with pooled samples described in Figure 1 (data not shown).

To evaluate whether the increase of p53 levels could reflect the accumulation of a biologically inactive protein, we examined the status of Bax protein levels, a well characterized direct p53 transcriptional target,¹⁹ as well as the expression of Bcl-2, which harbors a p53-responsive element,²⁰ which physically interacts with bax²¹ and that is functionally connected to p53.²² Bax and Bcl2 are two proapoptotic and prosurvival Bcl2 proteins family members²³ that are either directly or indirectly transcriptionally

activated or repressed by p53, respectively.^{19,24} Figure 2 shows that the levels of Bax decreased with tumor grade in OD ($R^2=0.349$, $P<0.001$, Figure 2a) and OA ($R^2=0.327$, $P<0.001$, Figure 2c) while Bcl2 expression analysis in the same samples reveals an augmentation of Bcl2 protein expression in both OD ($R^2=0.31$, $P<0.05$, Figure 2e) and OA ($R^2=0.230$, $P<0.01$, Figure 2g). Thus, the modulations of Bax and Bcl2 expressions suggested a functional inactivation of p53 transcriptional activity. This was supported by the correlation analysis of Bax and Bcl2 protein levels with p53 levels that indicate a linear negative correlation between Bax and p53 in OD ($R^2=0.919$, Figure 2b) and OA ($R^2=0.860$, Figure 2d) and a positive relationship between Bcl2 and p53 in OD ($R^2=0.999$, Figure 2f) and OA ($R^2=0.884$, Figure 2h). Again, analysis of glioblastoma biopsies indicates either a decrease of bax (-92.7 ± 7 , $P<0.001$, Figure 2i) and an increase of Bcl2 ($+120.1 \pm 30$, $P<0.05$, Figure 2j) expression. This data clearly indicate a loss of function of p53-mediated control of Bax and Bcl2 in gliomas and suggest that tumors development, at least partly, results in the accumulation of transcriptionally inactive p53. This agrees well with previous studies showing that frequent mutations associated with p53 trigger a loss of function of the protein in gliomas.^{25,26} We therefore questioned whether p53 could act as a modulator of parkin promoter transactivation and whether p53 loss of function occurring in glioma could ultimately account for early and grade-dependent reduction of parkin observed in these tumors.

Parkin expression is decreased in various tumor types linked to p53 mutations

Recent studies indicated that parkin could be under-expressed in tumors due to either gene deletion or presence of somatic mutations.^{16,27} Thus, in order to exclude the possibility that the decrease in parkin expression described in Figure 1 was artifactually due to *parkin* gene deletion or metabolic instability resulting from *PARK2* missense mutations,²⁸ we have analyzed both *PARK2* and *TP53* genetic status and mutation profile. We have found 4 out of 54 samples displaying an allele deletion and all other samples were wild-type *PARK2* (Table 1). Furthermore, all parkin mutations identified correspond to constitutional mutations (polymorphism) as they were also present in the plasma DNA from the same patients and therefore do not affect overall parkin structure/levels. The sequencing of samples also allowed us to identify those bearing a mutated p53 (Table 1) and to establish the proportions of mutated *TP53*-linked tumor within subgroups. About 20–40% of the samples harbor a p53 mutant protein (Table 2). It should be noted that, according to the MUT-TP53 2.0 matrix allowing predicting the transcriptional activity status of mutant p53,^{29,30} all mutations were considered as fully inactivating except those found at positions 90, 15 and 138 (see Supplementary Table 2). However, in the latter cases, an additional inactivating mutation was found to be present on *TP53* gene (see mutations 175, 234 and 245 in biopsies no. 1237, 1241 and 1324, respectively in Supplementary Table 2). The above set of data led us to examine the expression levels of parkin (samples harboring an allele deletion have been omitted) in *TP53*-mutated tumors. Figure 3 shows first that the omission of samples, in which parkin had been deleted does not modify the grade-dependent decrease of parkin expression in tumors harboring either wild-type or mutated *TP53* (Figure 3a). Interestingly, this grade-dependent reduction was still observed when only samples harboring a *TP53* mutation were considered (Figure 3b). Accordingly, the examination of Bax and Bcl-2 expressions in mutated p53-containing samples only, confirmed the grade-dependent modulation of the expression of these proteins (Figures 3c and d). Figure 4 shows that parkin levels are grade-dependently reduced in all tumor types. Overall, the above set of data confirms the drastic reductions of parkin levels in all tumor types associated with a

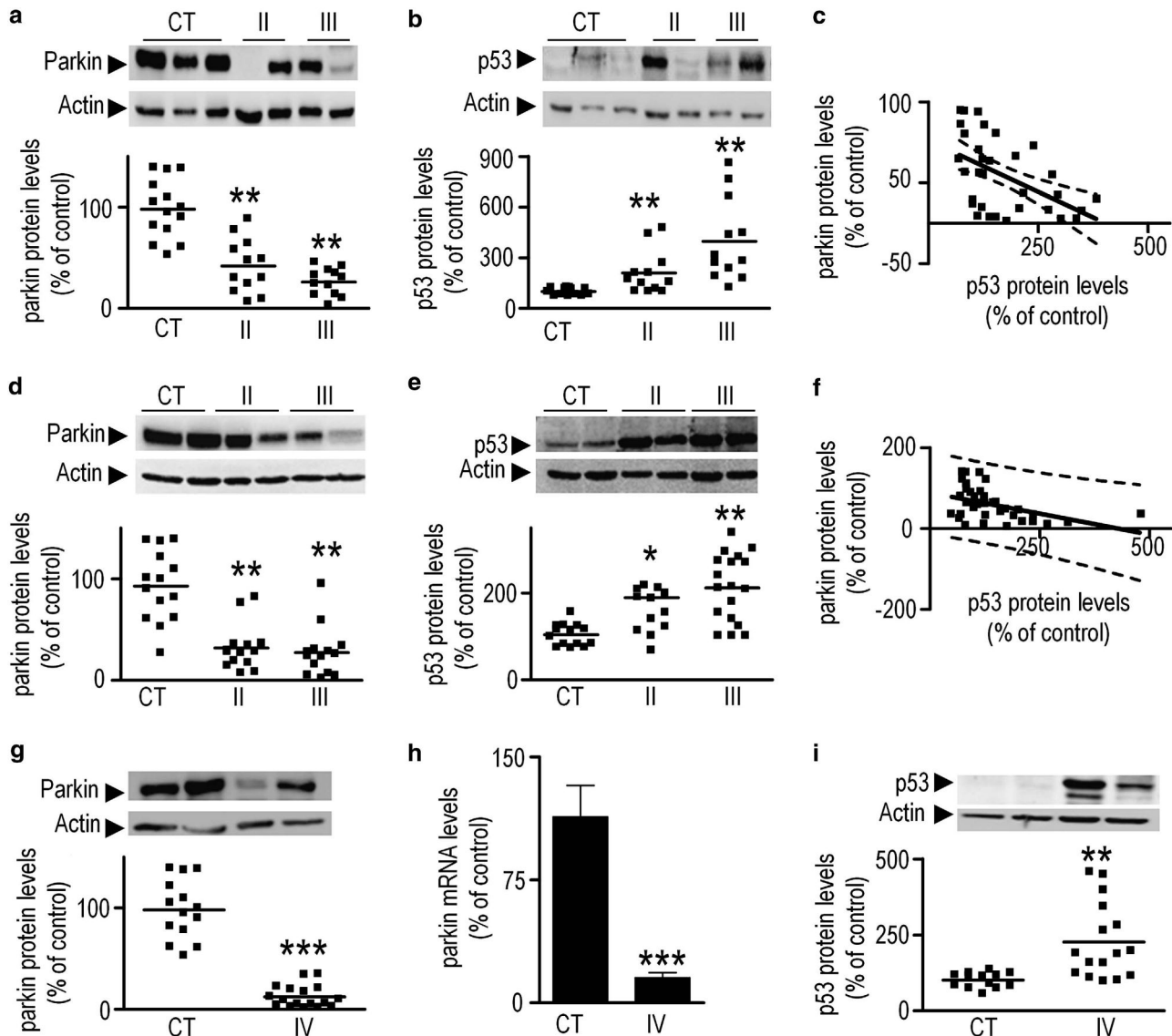


Figure 1. Parkin and p53 protein levels are inversely correlated to oligodendroglioma, mixed gliomas and secondary glioblastomas human brain tumor grade. (a–f) depict the protein levels of parkin and p53 in function of the brain tumor grade in oligodendroglioma (a, b) and mixed gliomas (d, e) biopsies. Correlation analysis of parkin versus p53 levels are shown in (c) for OD and (f) for mixed gliomas. CT corresponds to control epilepsy samples and II, III corresponds to brain tumor grade according to WHO criteria as described in Materials and methods. Actin analysis was used to normalize protein load charge. (g–i), shows the analysis of parkin protein (g) and mRNA (h) levels and p53 expression (i) as described in Materials and methods in glioblastoma (IV) samples. (a–i) Statistical analysis (P) determinations represented by a number of (*) code (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) are obtained by either ANOVA (a, b, d, e, versus CT group) or Student's *t*-test (g–i, versus CT group).

TP53 mutation and suggest a direct link between parkin expression and tumor grades.

Cancer-associated *TP53* mutations or p53 dominant negative trigger reductions of parkin protein levels and promoter transactivation

Parkin depletion and p53 accumulation could be seen as concomitant but unrelated events occurring in glioma. Alternatively, one could envision that the loss of function of p53 documented above could account for parkin depletion. In this context, we examined the status of parkin protein in various human glioblastoma cell lines (GL15, 42MG, 8MG), in which the presence of *TP53* mutations has been characterized^{31–33} (see Supplementary Table 3) and the SH-SY5Y³² human neuroblastoma cell line expressing wild-type p53 as a reference cell type. First, it

should be noted that glioblastoma cell lines mimic pathological brain biopsies in that they also express high levels of p53 (Figures 5a and b). In these cells, p53 is biologically inert as it appears unable to yield luciferase activity from a construct (PG13,³⁴) in which luciferase reporter gene was under the control of a canonical p53 responsive element (Figure 5c). Conversely, SH-SY5Y that harbors endogenous wild-type p53 expresses low levels of p53 in basal conditions (Figure 5a) and as corollary exhibit remarkable p53 activity (Figure 5c). Of most interest, unlike SH-SY5Y, glioblastoma cell lines display very low levels of parkin protein and mRNA levels (Figures 5d–f). Therefore, one can conclude from the above set of data that p53 inactivation by mutations in glioblastoma cells leads to enhancement of p53-like immunoreactivity and concomitantly yields low levels of parkin. Again, this data argues in favor of a p53 loss of function-associated downregulation of parkin mRNA and protein levels.

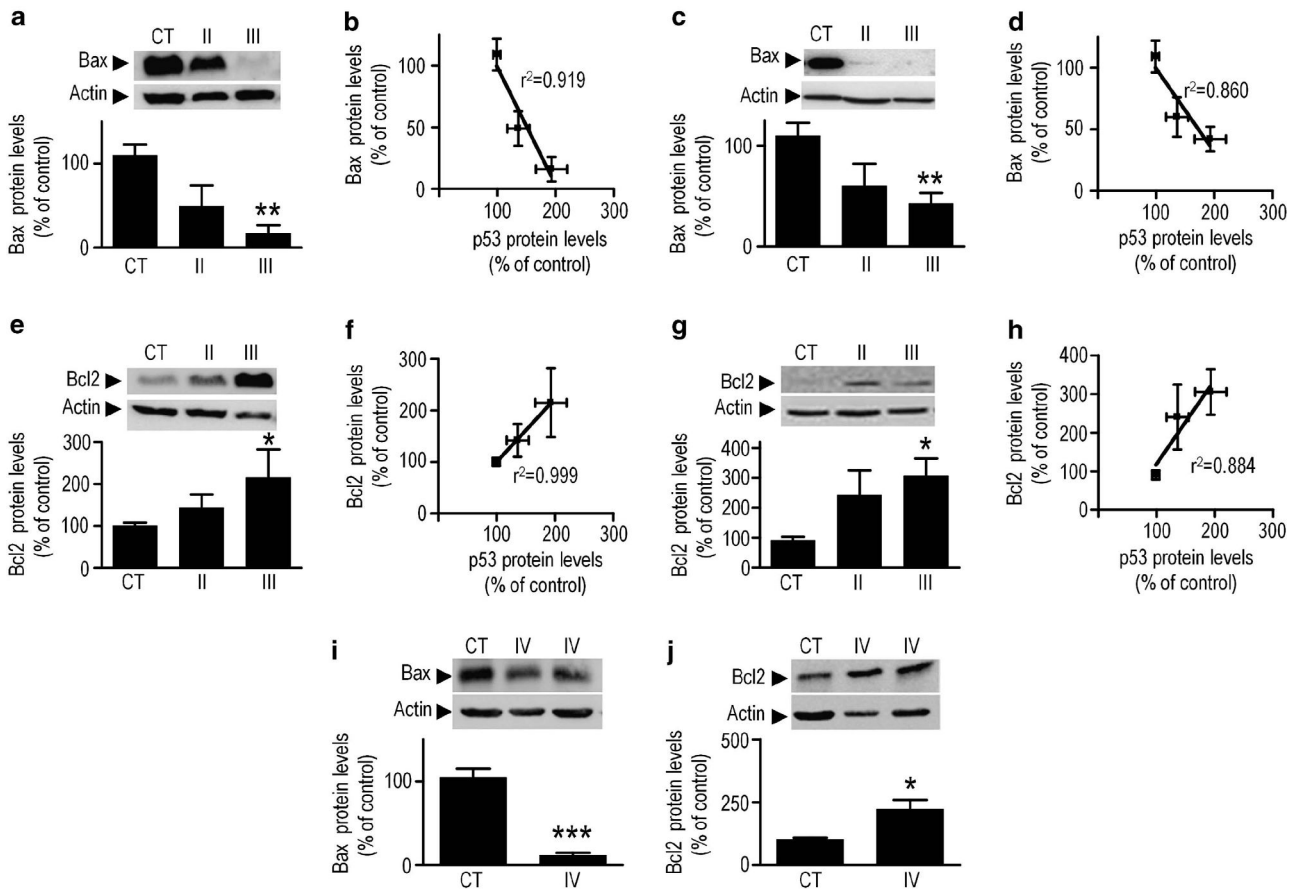


Figure 2. Bax and Bcl-2 expression are correlated with p53 in oligodendroglioma, mixed gliomas and secondary glioblastomas according to human brain tumor grade. (a–d) depict the protein level of Bax and its correlation analysis with p53 in OD (a, b) and mixed gliomas (c, d) according to grade. (e–h) depict the protein level of Bcl2 and its correlation analysis with p53 in OD (e, f) and mixed gliomas (g, h) according to grade. CT corresponds to control epilepsy samples and II, III corresponds to brain tumor grade according to WHO criteria as described in Materials and methods. Actin analysis was used to normalize protein load charge. (i, j) show the analysis of Bax (i) and Bcl2 (j) protein in glioblastoma (IV) samples. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

To definitely confirm this conclusion, we assessed the ability of wild-type and mutated p53 to modulate parkin expression and promoter transactivation. SH-SY5Y were transiently transfected with empty vector or p53 complementary DNA (cDNA) constructs either wild-type or harboring the R175H or the R273H mutation. It should be noted that the R273H mutation is the one occurring in the 8-MG glioblastoma cell line studied in Figure 5. Figure 3 indicates that both parkin protein levels (Figure 5g) and promoter transactivation (Figure 5h) were increased by the overexpression of wild-type p53 cDNA while p53 mutations fully abolished p53-associated increases of parkin protein and promoter transactivation. Finally, we have taken advantage of a cell model, in which an inactive dominant-negative p53 is overexpressed (MCF7-DD p53, see Materials and methods) to further confirm that the transcriptional inactivation of p53 leads to a diminution of parkin expression (-44.8 ± 15.8 , $n = 4$, $P < 0.05$, Figure 5i). The above set of data shows that one of the physiological roles of p53 is likely to transcriptionally upregulate parkin protein and suggests that TP53 mutations abolish this function, thereby leading to a cellular deficit of parkin.

p53 deletion triggers reduction of parkin protein and mRNA levels in cells and in mice brain

As a complementary approach, we have examined the impact of endogenous p53 on parkin protein, promoter activity and mRNA levels in two distinct cell types, in which p53 had been invalidated.

p53 deficiency in Human Colorectal adenocarcinoma (HCT116-Δp53) leads to a decrease of parkin expression ($-69.7\% \pm 7.9$ versus HCT116 control cells, $P < 0.001$, Figure 6a). We also compared mouse fibroblasts, in which either $p19^{Arf-1}$ or $p19^{Arf-1}$ and p53 had been deleted.³⁵ First, interestingly, the depletion of endogenous p53 leads to decreased parkin promoter transactivation and mRNA levels (-94 , 4% , $n = 6$, $P < 0.01$, Figure 6b and $-74.0\% \pm 20.8$, $P < 0.01$, Figure 6c; compare lanes (–) of black and empty bars). As it was shown in SH-SY5Y (see Figures 5g and h), complementation experiments by wild-type p53 cDNA transfection rescues parkin promoter activation in both $p19^{Arf-1-/-}$ and $p19^{Arf-1-/-}$ p53 $^{-/-}$ fibroblasts (compare lanes (–) and (+) for black and white bars in Figure 6b), an observation corroborated by increased levels of parkin mRNA (Figure 6c). This data confirm the positive control of parkin by p53 and importantly shows that this conclusion is not cell specific and stands for both endogenous and overexpressed wild-type p53.

In order to establish whether p53-dependent control of parkin also takes place *in vivo*, we have first investigated the status of parkin in wild-type and p53-knockout mice brain. We have observed a reduction of both parkin expression ($-42.0\% \pm 9.5$, $n = 5$, $P < 0.05$, Figure 7a) and mRNA ($-65.0\% \pm 22.0$, $n = 5$, $P < 0.05$, Figure 7b) levels. Importantly, we establish that p53-viral infection increases parkin protein expression and mRNA levels in mice brain (Figure 8). Thus endogenous and overexpressed p53 both upregulate parkin protein and mRNA levels, *in vivo*.

Table 1. Mutational analysis of parkin (Park2) and TP53 in human brain tumor biopsies

Grade	Cell type	ID	PARK2 mutations					p53 mutations					
			SNP	Location	Codon	Change	a.a change	Mutation	SNP	Location	Codon	Change	a.a change
II	Oligodendroglioma	1237	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC en CCC	Pro en Arg
			Yes	—	—	—	—	Yes	No	Exon4	90	TCC en TTC	Ser en Phe
			Yes	—	—	—	—	Yes	No	Exon5	175	CGC en CAC	Arg en His
			Yes	—	—	—	—	Yes	No	—	—	—	—
		1309	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1487	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1507	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1547	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon6	213	CGA in CGC	Arg in Arg
		1790	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1823	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
	Mixed glioma	2001	Yes	Exon3	134	Ins CCA	Ins Pro	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2018	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
			Yes	—	—	—	—	Yes	No	Exon5	131	AAC in AGC	Asn in Ser
		1200	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon7	238	TGT in TTT	Cys in Phe
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1236	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1286	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1527	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon7	233	CAC in CAT	His in His
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	Yes	No	Exon8	280	AGA in GGA	Arg in Gly
		1630	Yes	Exon11	394	GAT in AAT	Asp in Asn	No	No	—	—	—	—
		1714	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon5	154	GGC in GTC	Gly in Val
	Astrocytoma	1967	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon6	213	CGA in TGA	Arg in STOP
		1171	Yes	Exon3	174	CTC in CTT	Leu in Leu	Yes	No	Exon8	273	CGT in TGT	Arg in Cys
III	Oligodendroglioma	1054	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
			No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
			No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
			No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1854	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1998	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2137	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2148	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon8	262	GGT in GTT	Gly in Val
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
	Mixed glioma	0666	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon8	267	CGG in TGG	Arg in Trp
			Yes	—	—	—	—	Yes	No	Exon8	273	CGT in TGT	Arg in Cys
		1231	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1241	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon6	220	TAT in TGT	Tyr in Cys
			No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1241	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon7	234	TAC in TGC	Tyr in Cys
			No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1324	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon2	15	AGT in TGT	Ser in Cys
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1381	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon5	138	GCC in GTC	Ala in Val
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	Yes	No	Exon7	245	GGC in TGC	Gly in Cys
		1384	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon7	248	CGG in CAG	Arg in Gln
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	No	—	—	—	—
	Astrocytoma	1522	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1818	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1825	Yes	Exon6	261	TTA in TTG	Leu in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2037	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
			No	—	—	—	—	No	Yes	Intron8	—	Exon9–2A > C	—
		2072	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
			Yes	Exon11	394	GAT in AAT	Asp in Asn	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2141	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon6	213	CGA in CGG	Arg in Arg
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon10	341	TTC in GAATC (delTinsGAA)	Reading frame shift
		2203	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon6	193	CAT in TAT	His in Tyr
			Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg

Table 1. (Continued)

Grade	Cell type	ID	PARK2 mutations					p53 mutations					
			SNP	Location	Codon	Change	a.a change	Mutation	SNP	Location	Codon	Change	a.a change
IV	Mixed glioma	1428	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1732	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1980	Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2026	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon5	161	GCC in ACC	Ala in Thr
		2068	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon7	248	CGG in TGG	Arg in Trp
		2140	No	—	—	—	—	No	No	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
	Glioblastoma	0060	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1491	No	—	—	—	—	No	No	—	—	—	—
		1543	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1688	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1999	No	—	—	—	—	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2050	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon7	235	AAC in GAC	Asn in Asp
		2055	Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	36	CCG in CCA	Pro in Pro
		2112	Yes	Exon6	261	TTA in TTG	Leu in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2134	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon6	193	CAT in TAT	His in Tyr
		2202	yes	Exon11	394	GAT in AAT	Asp in Asn	Yes	No	Exon8	273	CGT in CAT	Arg in His
								Yes	No	Exon7	248	CGG in CAG	Arg in Gln

Abbreviations: A.a, amino-acid; ID, sample identification; SNP, single nucleotide polymorphism. Bold items correspond mutated samples.

Table 2. Frequency of p53 mutations in human brain tumor biopsies

Cell type	Tumor grade		
	II	III	IV
Mixed glioma	38%	54%	—
Oligodendrogliomas	22%	33%	—
Glioblastoma	—	—	36%

p53 controls parkin transcription via its DNA binding properties. The above data concerning the loss of function of p53 transcriptional activity is supported by the levels of the well-established p53 transcriptional targets Bax in glioblastomas (see Figure 2). The fact that parkin promoter transactivation was also impaired by p53 mutations led us to envision that parkin could behave as a direct transcriptional target of p53. This hypothesis is supported by the fact that the two mutations shown to abolish p53-associated increase of parkin protein and mRNA (see data in Figures 5f–h) have been described as hot spot p53 glioma-associated mutations that are known to abolish p53 DNA binding properties (for review see Brosh and Rotter³⁶). On the basis of this assumption, we have performed an *in silico* study of the human parkin promoter and we have identified a probable p53 consensus motif (Figure 9a). We have deleted part of this sequence from the parkin promoter (Figure 9a) and analyzed the impact of p53 overexpression on wild-type (Wt-hPK) or p53-deleted (Δ -hPK) parkin promoter activities. As would have been predicted, the overexpression of wild-type p53 leads to an upregulation of the wild-type parkin promoter activity ($+640.2 \pm 34.5$, $P < 0.0001$, Figure 9b), a feature fully abrogated by the deletion of the p53-responsive element (Δ -hPK, Figure 9b). Altogether, these data definitely demonstrates that p53 controls parkin transcription via its interaction with

parkin promoter. This agrees well with a recent study by Zhang et al.³⁷ that shows that p53 physically interacts with parkin promoter by ChIP analysis.

DISCUSSION

Several theoretical and experimental grounds suggested that parkin could contribute to cancers etiology. Thus, parkin gene is located at a well-defined locus of chromosomal instability, FRA6, and was deleted in both breast and ovarian cancers and two lung adenocarcinoma cell lines.¹² Lentivirus-induced expression of parkin leads to decreased tumorigenicity of parkin-deficient lung cancer cells in mice³⁸ and its epigenetic downregulation has been associated to acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia.³⁹ Interestingly, a recent paper by Veeriah et al.¹⁶ showed that somatic mutations of the parkin gene are associated to glioblastoma and other human malignancies. Noteworthy, the above-cited somatic mutations lead to mitotic instability and abolishment of the E3-ubiquitin ligase activity parkin canonical function.⁴⁰ The above set of data led to the proposal that parkin could act as a tumor suppressor.

p53 is also a tumor suppressor, the mutations on which trigger various types of tumors.²⁵ Indeed, most tumors show a drastic increase in the levels of loss of function of p53 mutants and p53 accumulation is often predictive of p53 mutations.^{25,26} Our analysis of p53 mutations and expression levels in OD, OA and secondary glioblastomas indicated about 20–50% of samples bearing a p53 mutation revealed a grade-dependent accumulation of p53 protein levels (see Figure 1) in agreement with several works based on immunohistochemical approaches.^{41–43}

Why do mutant p53 levels increase in tumors? Several studies indicated that this could be due to the impairment of its ubiquitination and subsequent degradation by the proteasomal machinery.⁴⁴ Mdm2 has been described as a key ubiquitin-ligase

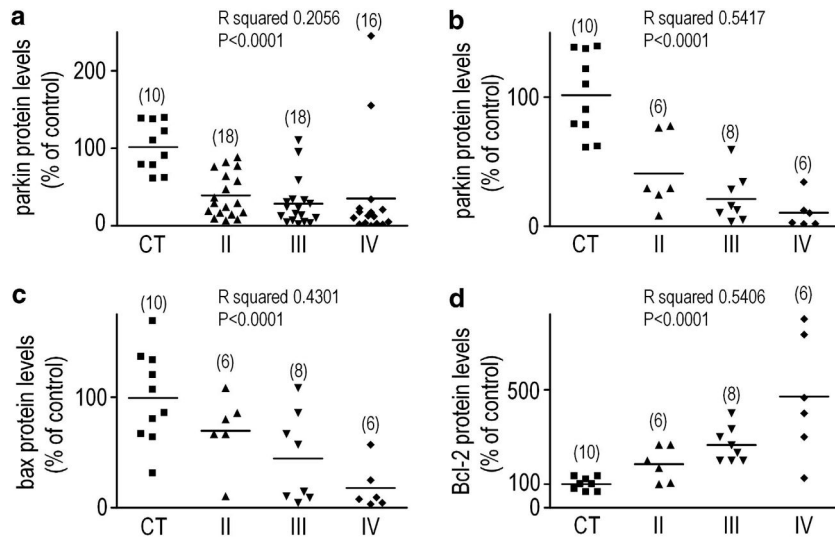


Figure 3. Analysis of the correlation between parkin, Bax and Bcl-2 protein levels and brain tumor grade according to the TP53 mutation status. Parkin levels were analyzed in whole samples (a) or in mutant p53-linked tumors (b) according to the indicated tumor grade by western blotting as described in Materials and methods. Bax (c) and Bcl-2 (d) expression in the indicated mutant p53-containing biopsies were analyzed as described in the Materials and methods. Numbers of samples is indicated in parenthesis. Mean values of control (CT) samples were taken as 100.

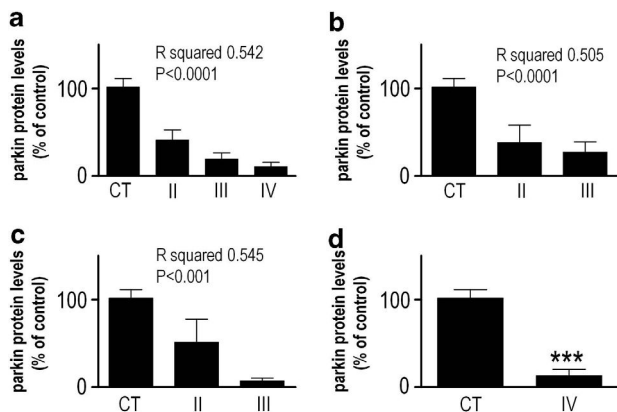


Figure 4. Parkin correlation to the tumor grade of oligodendroglioma, mixed gliomas and glioblastomas is linked TP53 mutations. (a–d) depict the protein levels of parkin and mutated TP53 in function of the indicated tumor grade in whole-tumor samples (a), mixed gliomas (b), oligodendroglioma (c) and glioblastoma (d) biopsies compared with control levels (CT). Protein analyses were carried out by western blotting as described in the Materials and methods and actin was used to normalize protein load charge. Correlation analysis of parkin versus p53 levels are indicated by R squares and statistical analysis by P-values. *** $P < 0.001$.

involved in the ubiquitination and degradation of p53 by the proteasome.⁴⁵ Interestingly, as Mdm2 retains its ability to degrade mutated p53, it has been suggested that the accumulation of p53 is the consequence of its incapability to transactivate Mdm2.⁴⁶ However, this mechanism is likely not ubiquitous and one can envision alternative pathways leading to mutated p53 accumulation.

We have recently shown a novel function of parkin as transcription repressor of p53.¹⁷ Thus, we established that parkin physically interacted with the p53 promoter and that germline PD-associated parkin mutations fully abolished parkin-mediated trans-repression of p53,¹⁷ suggesting a possible molecular connection between parkin expression, p53 control and tumorigenicity. This led us to examine the status of parkin

expression in glioma, the putative correlation between parkin and p53 levels according to tumor grades and the functional interplay between these two proteins that could explain the modulation of their expression during gliomas progression.

In the present study, we first establish that parkin protein and mRNA levels are decreased as tumor grades increase. That this observation stands for two independent cohorts is not anecdotic as biological tissue variability, technical aspects such as surgical acts to remove biopsies and immunohistological assessment of tumors could bring uncertainty in grade classification. Of most interest, parkin levels inversely correlate with p53 expression (see Figure 1), particularly in those cases where samples harbor a p53 mutation (Figures 3 and 4). This biochemical correlation did not *per se* indicate that the two events were directly correlated. In order to confirm a functional link between the two proteins, we have examined whether p53 could modulate parkin at a transcriptional level. This was motivated by the fact that most of cancer-associated mutations of p53 are associated to a loss of its transcriptional activity.⁴⁷ This statement was comforted in our study by the observation that the expressions of two direct and indirect p53 transcriptional targets, Bax and Bcl2, were respectively, negatively and positively correlated with p53 expression according to tumor grade (see Figure 2), thereby confirming p53 loss of DNA binding activity in these tumors. Moreover, we show that in three distinct human glioma cell lines (GL15, 8MG and 42MG), high levels of p53 accompany low expressions of parkin, a phenotype totally opposite to the one observed in SH-SY5Y cells. Thus, human glioma cell lines expressions of parkin and p53 mimic that observed in high-grades biopsies and therefore, appear as relevant models to study putative p53-mediated control of parkin transcription and expression. The above data are in full agreement with a study that established decreased levels of parkin in gliomas, and which shows an inverse relationship between parkin function and glioma-related mortality.⁴⁸

We demonstrate here that p53 controls parkin promoter transactivation. This conclusion stands in five independent lines of data. First, parkin protein levels and promoter transactivation were enhanced by wild-type p53 overexpression, the mutations on which abolish this phenotype. Second, the depletion of endogenous p53 in two distinct cell lines triggers reductions of

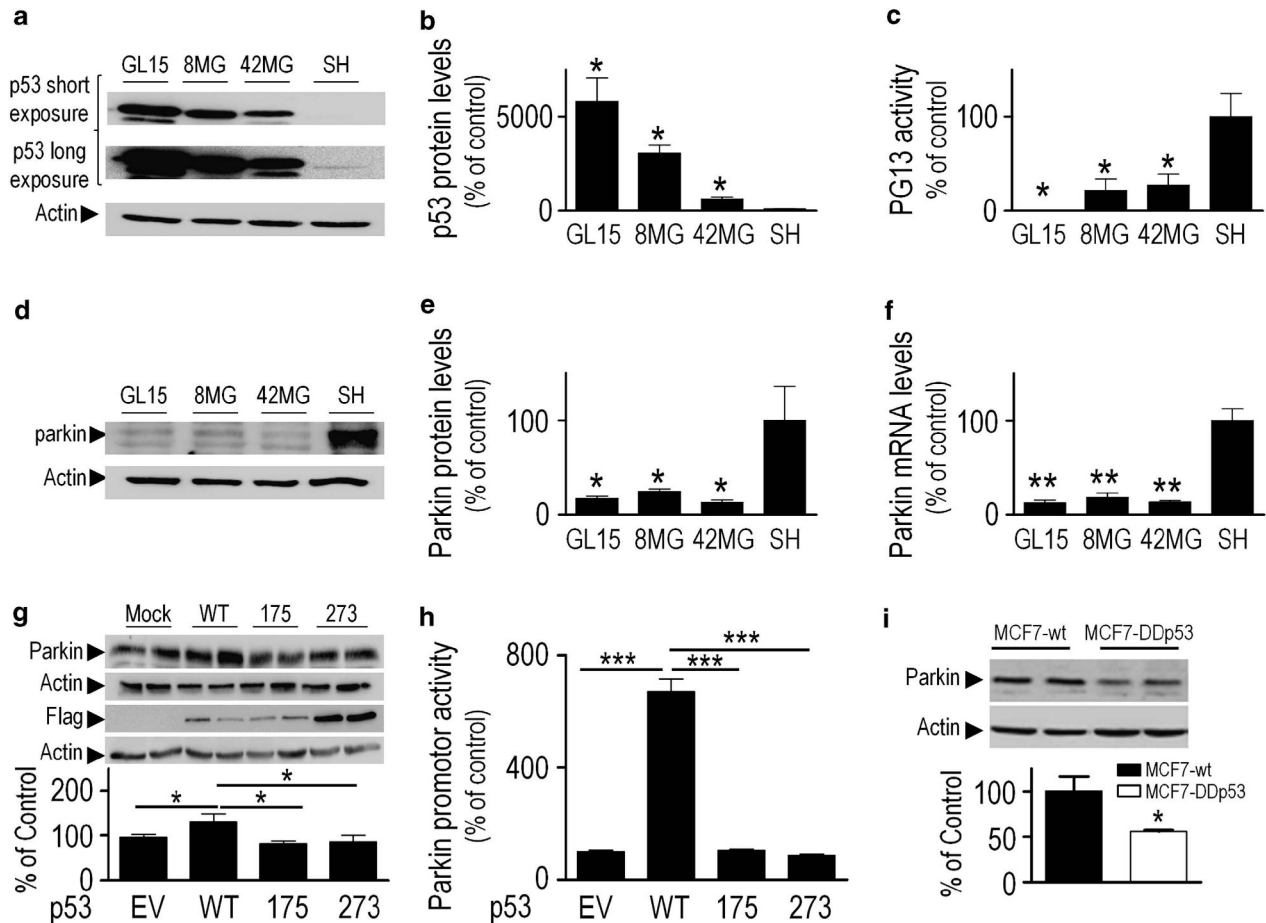


Figure 5. Dominant negative or cancer-related mutations of p53 abolish its ability to regulate parkin protein levels and promoter transactivation. (a–e) illustrate p53 (a, b) or parkin (d, e) protein levels, p53 transcriptional activity (c) and parkin mRNA levels (f) measured in the indicated glioblastoma (GL15, 8MG or 42MG) or neuroblastoma (SH-SY5Y, SH) cell lines, by western blot and PG13 analysis as described in Materials and Methods. (g, h) show the effect of overexpressed empty vector (EV), wild-type (WT) and mutated (R175H, (175) and R273H, (273)) p53 constructs on parkin protein levels (g) and promoter activity (h) in SH-SY5Y cells. (i) shows parkin protein levels in MCF-7 cells expressing (MCF-7-DDp53, white bars) or not (MCF7-wt, black bars) a dominant negative truncated p53. Quantifications correspond to parkin densitometric analyses normalized by actin protein charge loading control. Bars are the means $\pm$ s.e.m. of 4–6 independent determinations (two independent experiments performed in duplicate or triplicates). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not statistically significant.

parkin expression, promoter transactivation and mRNA levels. Third, a cell line expressing a p53 dominant-negative also displays lowered parkin expression. Fourth, ablation of a putative consensus binding sequence targeted by p53 on parkin promoter fully blocks p53-associated increase of parkin promoter transactivation. Fifth, importantly, our data show that parkin protein and mRNA levels are reduced in p53-knockout mice and increased after p53 viral infection in mice brain. Altogether, our data undoubtedly demonstrate that p53 positively controls parkin promoter transcription *in vitro* and *in vivo* and that cancer-associated mutations on p53 impair this control and likely contribute to lowering parkin expression along with tumor progression. This agrees well with a recent study showing that human parkin gene indeed behaved as a transcriptional target of p53 that directly binds to parkin gene.³⁷

Parkin expression is often reduced in tumors and our data demonstrate that this can be accounted for by decreased p53-mediated transcriptional control. It is striking that conversely, p53 augmentation in tumors could, at least in part, be due to reduced parkin expression. Thus, we have recently demonstrated that parkin acts as a direct transcriptional repressor of p53.¹⁷ It is therefore tempting to envision a functional interplay between parkin and p53 (Figure 10). In physiological conditions, parkin

lowers wild-type p53 and thereby, lowers its own production. This feed-back mechanism likely contributes to maintain a cellular homeostasis between parkin and p53. In tumors, transcriptionally inactive mutated p53 would lose its capacity to upregulate parkin promoter transcription, thereby explaining reduced levels of parkin protein. Accordingly, lowered parkin levels would therefore lead to reduced trans-repression of p53 explaining the accumulation of mutated p53. This cross-talk would feed a vicious cycle, by which tumorigenicity could progress.

This reduction of the tumor suppressive function of parkin and its functional dialog with p53 identifies parkin as a key molecular player in glioma biology, but also a new grade-related biopsy biomarker and our study may delineate new potential tracks to pharmacologically interfere with glioma progression.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), Human Colorectal adenocarcinoma (HCT116), SH-SY5Y human neuroblastoma, the human breast cancer (MCF-7) and the human (42MG, GL15, 8MG) glioma cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 μ g/ml) in 5% CO₂. Immortalized mouse embryonic fibroblasts invalidated for the p53

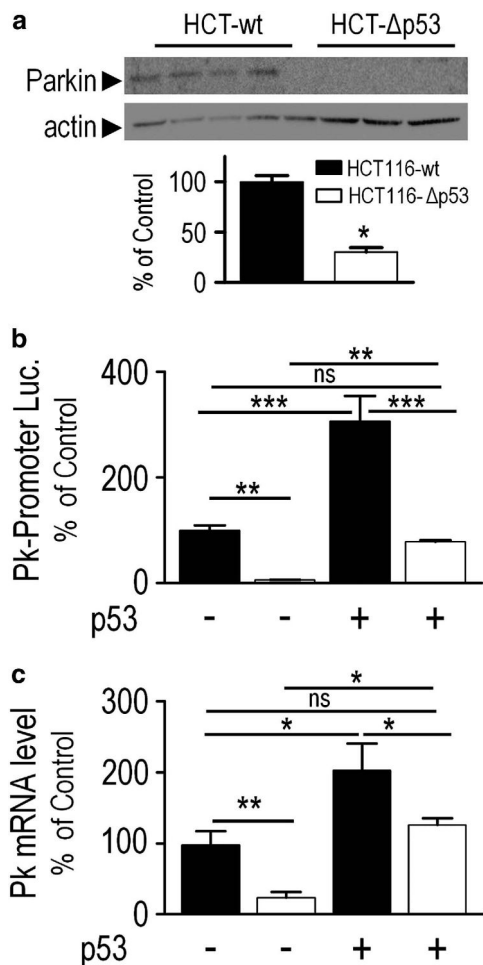


Figure 6. Endogenous and overexpressed p53 control Parkin expression, promoter transactivation and mRNA levels. **(a)** shows parkin expression in wild-type HCT116 (HCT-wt, black bars) or p53-deficient HCT116 (HCT-Δp53, white bars) cells. Bars represent the means $\pm$ s.e.m. of eight independent determinations (two independent experiments performed in quadruplicates). **(b, c)** show parkin promoter transactivation **(b)** and parkin mRNA levels **(c)** in p19Arf^{-/-}-p53^{+/+} (black bars) or p19Arf^{-/-}-p53^{-/-} (white bars) fibroblasts after transient transfection with either empty vector (–) or p53 cDNA (+). Bars are the means $\pm$ s.e.m. of six independent determinations (three independent experiments performed in duplicates). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not statistically significant.

and p53/p19^{arf} genes³⁵ or MCF-7 cells¹¹ expressing either wild-type or a dominant negative truncated p53 mutant, were provided by Drs Roussel and Bourdon, respectively. Transient transfection of SH-SY5Y and mouse fibroblasts (MEF), were respectively carried by means of either lipofectamine 2000 (Invitrogen, Saint Aubin, France) or Nucleofactor kit (Amaxa Biosystems, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions as previously described.⁴⁹

Constructs

The wild-type 154 bases human parkin promoter construct provided by Dr West (Johns Hopkins University Scholl of Medicine, Baltimore, USA) has been previously described.⁵⁰ The deletion of the –42 to –45 nucleotides region on the wild-type human parkin promoter that constitutes the core p53 putative binding site (located between nucleotides –48 to –41, considering as +1 the A of the start codon) was performed by site-directed mutagenesis kit (QuikChange II, Stratagene, La Jolla, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The primers used were: forward hprPKdelp53-S (5'-GCGCCGCTGCGGGCCTGTTCTGGCCCG-3') and reverse hprPKdelp53-AS (5'-CGGGCCAGGAACAGGCCCGCGCAGCGGCGC-3').

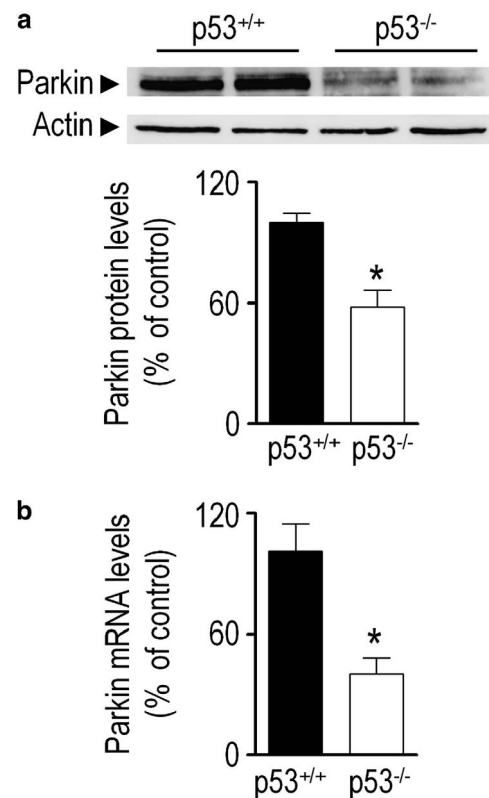


Figure 7. Parkin expression is reduced in p53 knockout mice brain. **(a)** illustrates parkin and actin protein levels in brain homogenates derived from wild-type (p53^{+/+}) and knockout (p53^{-/-}) p53 mice brains. Bars represent densitometric analyses and are the means $\pm$ s.e.m. of four brains. * $P < 0.05$. **(b)** illustrates parkin mRNA levels in the brain samples analyzed in **(a)**. Bars represent the relative concentration of parkin mRNA levels expressed as the percent of control p53^{+/+} mice brain and are the means $\pm$ s.e.m. of four brains. * $P < 0.05$.

A BamHI/XbaI fragment containing the human p53 coding sequence and a flag tag sequence has been subcloned in the pCDNA3.1 (+) from Invitrogen. The p53 R175H and R273H mutants were obtained by site-directed mutagenesis of the p53-pcDNA3.1 (+) flag tag construct. We used the forward p53R175H-S (5'-CGGAGGTTGTGAGGCACTGCCCCACCA TGAGC-3') and the reverse p53R175H-AS (5'-GCTCATGGTGGGGCAGTGCC TCACAACCTCCG-3') primers to obtain the R175H mutant and the forward p53R273H-S (5'-CGGAACAGCTTTGAGGTGATGTTGTGCTGTCCTGGG-3') and reverse p53R273H-AS (5'-CCCAGGACAGGCACAAACATGCACCTCAAAG CTGTTCCG-3') primers for the R273H mutant.

Patient samples

Cohort1. Human samples were gathered by the tumor bank of the Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière UMRS 975, Paris, France.

Fifty-four patients who underwent a craniotomy for tumor resection were included in this retrospective study concerning the 2004–2012 period. Only patients satisfying the following inclusion criteria were kept for our study: minimal age of onset of 18-years-old, diagnosis of gliomas according to the WHO criteria and available clinical data. This cohort includes 18 grade II (9 oligodendrogliomas, 8 mixed gliomas and 1 astrocytoma), 20 grade III (6 OD, 13 mixed gliomas and 1 astrocytoma), 16 grade IV (10 glioblastoma and 6 mixed glioblastoma) and 10 control (non-related epilepsy surgery-derived samples) groups. Tumor samples were snap-frozen and stored at –80 °C immediately after surgical resection. High-molecular weight DNA was isolated from both tumor and peripheral blood using a standard phenol-chloroform procedure. A written informed consent from all patients and validation by a local ethical committee were obtained for this study allowing molecular, genetic

and translational research studies on cancer tissue samples. The analysis was performed on anonymized data.

Cohort2. Human samples were gathered by Prof Honnorat in collaboration with the Neuropathological service of the Neurological and Neuro-Surgical Hospital and Neurobiotec structures (Lyon, France).

Eighteen patients submitted to a craniotomy for tumor resection were included in this retrospective study concerning the 1992–2011 period.

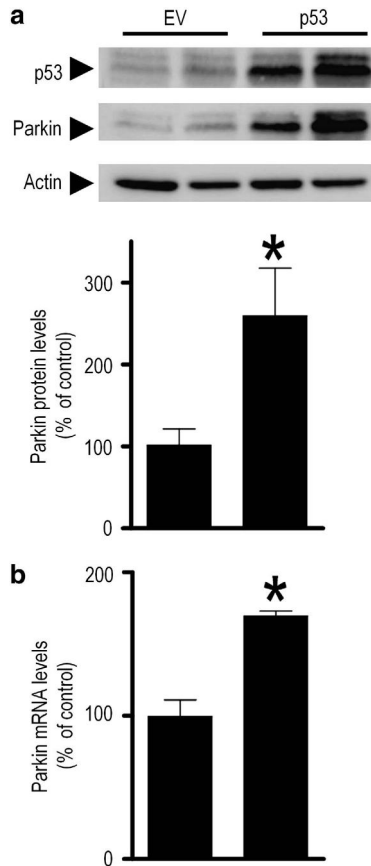


Figure 8. Viral overexpression of p53 triggers increased protein and mRNA levels of parkin in mice brain. Mice were injected bilaterally with control (eGFP adenovirus) and p53 viruses (107 PFU in each hemisphere). Ten days after infection, the two halves of the brains were processed for either protein (a) or mRNA (b) expressions as described in the Materials and methods. Bars represent the relative concentration of parkin protein or mRNA levels expressed as the percent of control mock-infected mice brain (taken as 100) and are the means $\pm$ s.e.m. of five brains. * $P < 0.05$.

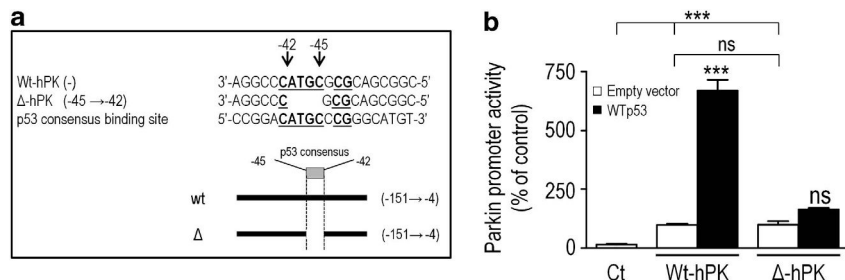
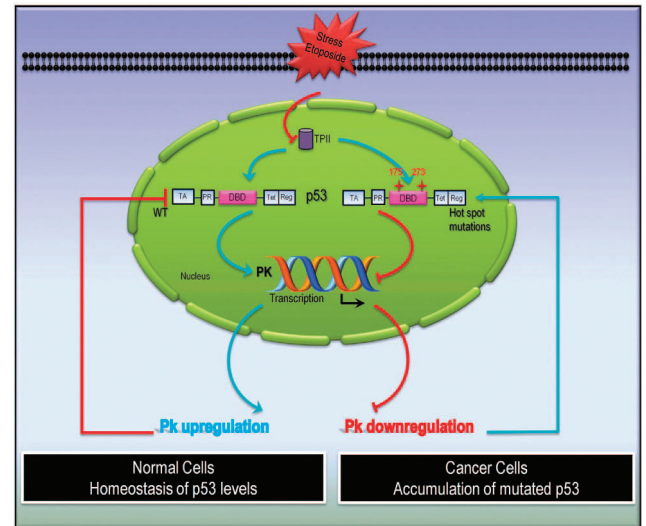


Figure 9. Deletion of a putative p53 binding site on human parkin promoter abolishes its responsiveness to p53-mediated transactivation. Schematic representation of wild-type (Wt-hPK) and Δ -hPK human promoter constructs (a). Location and sequence of the p53 responsive element on parkin promoter are indicated. Theoretical p53 consensus binding site is indicated for comparison. (b) represents the analysis of Wt-hPK and Δ -hPK promoter activity after transient co-transfection of SH-SY5Y cells with either empty vector (white bars) or wild-type p53 cDNA (black bars). Bars are the means $\pm$ s.e.m. of six independent determinations (two independent experiments performed in triplicates). *** $P < 0.001$; ns, not statistically significant.

The patient's inclusion criteria and ethical procedures those described for cohort1. This cohort included six samples per tumor grade (II, III) OD, six grade IV (glioblastoma) and four controls non-related epilepsy surgery-derived samples.

Western blot analyses

Proteins (50 μ g for biopsies and cell homogenate samples and 100 μ g for mice brain samples) were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels and wet-transferred to Hybond-C (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) membranes. Then, samples were immunoblotted using mouse monoclonal anti-parkin (MAB5512, Chemicon, Billerica, MA, USA), anti-flag (Sigma, Lyon, France) and anti-Bcl2 (SC7382, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) antibodies or with rabbit polyclonal anti-p53, (CM1 provided by JC Bourdon) and anti-bax (6A7, Pharmingen,



Franklin lakes, NJ, USA) antibodies. Immunological complexes were revealed with either anti-rabbit or anti-mouse IgG-coupled peroxidase antibody (Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, UK) by electrochemiluminescence detection method (Roche Diagnostics, Meyland, France). Chemiluminescence was recorded using a luminescence image analyzer LAS-3000 (Raytest, Fuji, Asnières, France), and quantification of non-saturated images were performed using the FUJI FILM Multi Gauge image analyzer software.

Real-time PCR analysis of parkin mRNAs in cells and mice brains

RNA from cells and mice brains or human biopsies were extracted using the NucleoSpin RNA II or the RNeasy kit, respectively following manufacturer's instructions. After DNase treatment, total RNA was reverse transcribed (AMV-transcriptase, Promega, Madison, WI, USA) then subjected to real-time PCR by means of a Rotor-Gene6000 apparatus (Qiagen, Hilden, Germany), using the SYBR Green detection protocol. Specific-gene primers were designed by means of the Universal Probe Library Assay Design Center software (Roche Applied Science, Meylan, France) and expression levels of mouse (forward: 5'-GCATCCCTTGCATAGCGTG-3'; reverse: 5'-GGAAGACCAGGACAGGGCTC-3') and human (forward: 5'-CCTGCCTTGTGTGGCT-3'; reverse: 5'-TCCTCTGCACCATAGTG-3') *parkin* genes were normalized for RNA concentrations by mouse γ -actin (forward: 5'-CACCATCGGTGTAGTGGC-3'; reverse: 5'-CAGGTGTCGATGCAACGTT-3') or human *GAPDH* (forward: 5'-TGGGCTACACTGACACAG-3'; reverse: 5'-CAGCGTCAAGGTGGAGGAG-3') mRNA expression levels.

Stereotaxy and viral injection

Adult females C57Bl/6 (P90) were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg body weight; Ketamine 1000; Ceva, Bruxelles, Belgique) and xylazine (10 mg/kg body weight; Rompun 2%; Centravet, Plancoet, France) dissolved in 0.9% sterile saline and positioned in a stereotaxic frame. Animals of each group (control and wild-type p53) were injected bilaterally into the striatum, using appropriate coordinates (1 mm anterior to the bregma, 2 mm lateral and 3 mm deep from the skull surface) with either eGFP adenovirus or adenovirus expressing human p53 and GFP (10^7 PFU in each hemisphere; Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA). Animals were killed 3, 7 and 14 days after injection. Proteins and mRNA were extracted from whole brains and analyzed as described above.

p53 activity and parkin promoter transactivation

The p53 transcriptional activity, wild-type or mutated parkin promoter transactivation (see constructs section) were measured as described⁵¹ after co-transfection of 0, 5–1 μ g of the above cDNAs and 0, 2–0, 5 μ g of β -galactosidase cDNA in order to normalize transfection efficiencies as described.⁵¹ Luminescence was measured as reported.¹⁹

1 mb genomic bacterial artificial chromosome ARRAY-CGH

A full-coverage genomic bacterial artificial chromosome aCGH with an average resolution of 1 mb, previously described,⁵² was used for DNA copy number analysis. The procedures for DNAs extraction, hybridization and washing have been described previously.⁵³ Arrays were scanned using a 4000B scan (Axon, Union City, CA, USA). Image analysis was performed with Genepix 5.1 software (Axon, Union city, CA, USA) and ratios of Cy5/Cy3 signals were determined. The ratio of Cy5/Cy3 of the bacterial artificial chromosome including or contiguous to the target gene investigated was attributed to the genes of interest. A ratio above at least 3.0 was fixed as the threshold to conclude that a gene amplification occurred. Data were normalized with microarray normalization MANOR, bacterial artificial chromosome status (gained, lost, amplified or normal) was determined using GLAD (Applied Optic Research, Woodland, WA, USA), and the final results were visualized with VAMP software (Woods Hole, MA, USA).

Mutation analysis of *PARK2* and *TP53*

All *PARK2* and *TP53* coding exons of all tumor and paired-blood plasma DNAs were analyzed by Universal tailed amplicon sequencing approach (454 Sequencing Technology, Roche) and confirmed by direct genomic sequencing of both DNA strands by Sanger's method. In brief, the Universal tailed amplicon sequencing with 454 GS Junior system implies a initial PCR amplification (using primers detailed in Supplementary Table S1 and amplification conditions available upon request) of high-molecular weight DNA extracted using standard phenol-chloroform procedures, a second PCR aiming MID (multiplex identifier) and 454 adapters

incorporation, an emulsion PCR step launched according to the emPCR Amplification Method Manual Lib-A protocol (GS Junior Titanium Series, Roche) and enrichment and pyrosequencing according to the Sequencing Method Manual (Roche). Mutations found with GS Junior were validated by Sanger sequencing method. To make sure of the somatic characteristic of each alteration and avoid polymorphisms, the constitutional DNA of each patient was also tested with Sanger. After amplification, PCR products were purified conforming to the Agencourt AMPure XP PCR purification protocol (Beckman Coulter, Villepinte, France) with the Biomek NX Automation Workstation. Sequencing reactions were performed in both directions using the Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Extension products were purified with the Agencourt CleanSEQ protocol according to manufacturer's instructions (Beckman Coulter). Purified sequences were analyzed on an ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Forward and reverse sequences were systematically analyzed.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software (www.graphpad.com version 4.00 for Windows, Software, San Diego CA USA) by using either the Student's *t*-test or one-way ANOVA with Newmann-Keuls's and linear trend *post hoc* tests. Correlation analysis was performed by means of the Pearson test (Pearson *r* and *P*-value determinations). Significant differences are: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Drs Roussel, Bourdon and Serrano are thanked for providing us with p53 knockout cells, MCF-7 cells and mice brains. Drs West and Oren are acknowledged for providing us with parkin-luciferase and PG13 constructs. JV was supported by AMPA (Association Monégasque Pour la recherche sur la Maladie d'Alzheimer) and ARC («Association pour la recherche contre le cancer»). This work was supported by the 'Fondation pour la Recherche Médicale' and by the 'Conseil Général des Alpes Maritimes'. This work has been developed and supported through the LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). Cristine Alves da Costa is recipient of a Hospital Contract for Translational Research (CHRT) between INSERM and the Hospices Civils de Lyon.

REFERENCES

- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 2007; **21**: 2683–2710.
- Bourdon JC, De Laurenzi V, Melino G, Lane DP. p53: 25 years of recherche and more questions to answer. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 397–399.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; **358**: 15–16.
- Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 862–873.
- Lim YP, Lim TT, Chan YL, Song AC, Yeo BH, Vojtesek B et al. The p53 knowledgebase: an integrated information resource for p53 research. *Oncogene* 2007; **26**: 1517–1521.
- Asker C, Wiman KG, Selivanova G. p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **265**: 1–6.
- Ohgaki H, Eibl RH, Wiestler OD, Yasargil MG, Newcomb EW, Kleihues P. p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res* 1991; **51**: 6202–6205.
- Nayak A, Ralte AM, Sharma MC, Singh VP, Mahapatra AK, Mehta VS et al. p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. *Neurol India* 2004; **52**: 228–232.
- Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; **170**: 1445–1453.
- Maintz D, Fiedler K, Koopmann J, Rollbrocker B, Nechev S, Lenartz D et al. Molecular genetic evidence for subtypes of oligoastrocytomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; **56**: 1098–1104.
- Deguin-Chambon V, Vacher M, Jullien M, May E, Bourdon JC. Direct transactivation of c-Ha-Ras gene by p53: evidence for its involvement in p53 transactivation activity and p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2000; **19**: 5831–5841.

- 12 Cesari R, Martin ES, Calin GA, Pentimalli F, Bichi R, McAdams H *et al.* Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5956–5961.
- 13 Letessier A, Garrido-Urbani S, Ginestier C, Fournier G, Esterni B, Monville F *et al.* Correlated break at PARK2/FRA6E and loss of AF-6/Afadin protein expression are associated with poor outcome in breast cancer. *Oncogene* 2007; **26**: 298–307.
- 14 Poulogiannis G, McIntyre RE, Dimitriadis M, Apps JR, Wilson CH, Ichimura K *et al.* PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 15145–15150.
- 15 Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y *et al.* Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2008; **27**: 6002–6011.
- 16 Veeriah S, Taylor BS, Meng S, Fang F, Yilmaz E, Vivanco I *et al.* Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. *Nat Genet* 2010; **42**: 77–82.
- 17 da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A *et al.* Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1370–1375.
- 18 Rotter V. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2613–2617.
- 19 Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; **80**: 293–299.
- 20 Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994; **54**: 3131–3135.
- 21 Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 1099–1109.
- 22 Hemann MT, Lowe SW. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1256–1259.
- 23 Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1351–1359.
- 24 Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA *et al.* Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* 1994; **9**: 1799–1805.
- 25 Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N *et al.* Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 523–530.
- 26 Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H *et al.* Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol* 1999; **1**: 124–137.
- 27 Wang F, Denison S, Lai JP, Philips LA, Montoya D, Kock N *et al.* Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; **40**: 85–96.
- 28 Henn IH, Gostner JM, Lackner P, Tatzelt J, Winklhofer KF. Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms. *J Neurochem* 2005; **92**: 114–122.
- 29 Soussi T, Hamroun D, Hjortsberg L, Rubio-Nevado JM, Fournier JL, Beroud C. MUT-TP53 2.0: a novel versatile matrix for statistical analysis of TP53 mutations in human cancer. *Hum Mutat* 2010; **31**: 1020–1025.
- 30 Edlund K, Larsson O, Ameur A, Bunikis I, Gyllenstein U, Leroy B *et al.* Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 9551–9556.
- 31 Costa SL, Paillaud E, Fages C, Rochette-Egly C, Plassat JL, Jouault H *et al.* Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma *in vitro*: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eur J Cancer* 2001; **37**: 520–530.
- 32 Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 151–157.
- 33 Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007; **28**: 622–629.
- 34 Ginsberg D, Oren M, Yaniv M, Piette J. Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene* 1990; **5**: 1285–1290.
- 35 Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997; **91**: 649–659.
- 36 Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 701–713.
- 37 Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ *et al.* Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 16259–16264.
- 38 Picchio MC, Martin ES, Cesari R, Calin GA, Yendamuri S, Kuroki T *et al.* Alterations of the tumor suppressor gene Parkin in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2720–2724.
- 39 Agirre X, Roman-Gomez J, Vazquez I, Jimenez-Velasco A, Garate L, Montiel-Duarte C *et al.* Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 2006; **118**: 1945–1953.
- 40 Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; **25**: 302–305.
- 41 Fulci G, Ishii N, Van Meir EG. p53 and brain tumors: from gene mutations to gene therapy. *Brain Pathol* 1998; **8**: 599–613.
- 42 Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996; **6**: 217–223, discussion 23–4.
- 43 Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J *et al.* Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5743–5750.
- 44 Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; **60**: 6788–6793.
- 45 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; **387**: 296–299.
- 46 Watanabe K, Lane DP. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene* 1997; **15**: 1179–1189.
- 47 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**: 49–53.
- 48 Yeo CW, Ng FS, Chai C, Tan JM, Koh GR, Chong YK *et al.* Parkin pathway activation mitigates glioma cell proliferation and predicts patient survival. *Cancer Res* 2012; **72**: 2543–2553.
- 49 Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B *et al.* Presenilin-dependent transcriptional control of the A β -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of β APP and APLP. *Neuron* 2005; **46**: 541–554.
- 50 West AB, Lockhart PJ, O'Farrell C, Farrer MJ. Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol* 2003; **326**: 11–19.
- 51 Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, Boyer N *et al.* Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2006; **26**: 6377–6385.
- 52 Idbaih A, Marie Y, Pierron G, Brennetot C, Hoang-Xuan K, Kujas M *et al.* Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann Neurol* 2005; **58**: 483–487.
- 53 Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C, Pierron G, Manie E, Raynal V *et al.* BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. *Int J Cancer* 2008; **122**: 1778–1786.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

p53 est un suppresseur de tumeurs bien connu dont les mutations sont présentes dans près de 50% des cas de cancers. Elles conduisent à la transformation des cellules saines en cellules tumorales et constituent un élément clé de la tumorigenèse.

La parkine est connue pour avoir une expression altérée dans de nombreux types de cancers, suggérant un rôle potentiel de suppresseur de tumeurs. De plus, elle est capable de réprimer transcriptionnellement l'expression de p53.

Ces éléments nous ont aiguillés vers un possible lien moléculaire entre la parkine et p53 dans le cadre du développement des gliomes. Le but de cette étude a été de caractériser le rétrocontrôle de p53 sur la parkine et ainsi mettre en évidence l'existence d'une boucle de régulation entre ces deux protéines, son rôle physiologique à l'équilibre, et son déséquilibre en condition pathologique.

Il existe une corrélation inverse entre l'expression de la parkine et l'expression de p53 dans les gliomes.

La parkine présente une expression très diminuée dans les oligodendrogliomes, les oligoastrocytomes de grade II et III et les glioblastomes (IV). J'ai mis en évidence que cette diminution d'expression pouvait être corrélée au grade du cancer. L'étude de p53 montre cette fois une augmentation de l'expression dans ces mêmes échantillons, là aussi corrélée au grade de la tumeur. La comparaison de l'expression de la parkine et p53 montre une corrélation inverse entre ces deux protéines.

Pour comprendre si la diminution d'expression de la parkine est liée à l'augmentation de l'expression de p53 je me suis intéressé à l'expression de Bax et Bcl-2. Il s'agit de deux protéines mitochondriales impliquées dans l'apoptose. Ce sont des cibles transcriptionnelles directe (Bax) et indirecte (Bcl-2) de p53. L'expression de Bax est diminuée et corrélée au grade du cancer alors que celle de Bcl-2 est augmentée. De plus, l'expression de ces protéines peut être corrélée à celle de p53. Cependant, l'effet observé dans les tumeurs n'est pas celui attendu suite à une augmentation de l'expression de p53, ce qui suggère que p53 ne remplit pas son rôle transcriptionnel, il est inactif.

L'expression de la parkine est diminuée dans plusieurs types de tumeurs en fonction de la présence de mutations de p53.

Afin d'examiner si la baisse d'expression de la parkine n'était pas due à des altérations génétiques, nous avons séquencé l'ensemble des échantillons pour la parkine. Seuls 4 échantillons présentent des délétions de park2. J'ai donc exclu ces quatre échantillons de l'analyse pour exclure tout biais. Les mêmes analyses furent réalisées pour p53. Nous avons trouvé environ 20% à 40% des échantillons (en fonction du type et du grade de la tumeur) mutés pour p53. J'ai vérifié l'impact de ces mutations sur l'activité de la protéine en utilisant un outil bio-informatique. Dans l'ensemble des échantillons mutés en p53 celui-ci est inactif. J'ai donc pu trier les échantillons en fonction du statut de p53. La diminution de l'expression de la parkine en fonction du grade de la tumeur est retrouvée dans ces échantillons mutés où elle est même renforcée par rapport au groupe total. Il en va de même pour l'expression de Bax et BCL-2.

Ces résultats confirment la diminution d'expression de la parkine observée dans les gliomes et suggèrent l'existence d'un lien direct entre l'expression de la parkine et le grade de la tumeur.

Des mutations de p53 fréquemment associées aux cancers entraînent une diminution d'expression de la parkine et la transactivation de son promoteur.

La diminution d'expression de la parkine couplée à l'augmentation de l'expression de p53 dans les gliomes peuvent être considérées comme des événements non liés ayant lieu lors du développement des gliomes. Nous avons donc étudié l'expression de la parkine dans différentes lignées cellulaires de glioblastomes où le statut en p53 est connu. Il apparaît que l'expression de la parkine est diminuée alors que celle de p53 est augmentée tout comme dans les biopsies. Cependant, p53 est ici inactif comme le montre son incapacité à activer la transcription d'une construction rapportrice PG13, dans laquelle le gène rapporteur de la luciférase est couplé à des éléments de réponse canoniques de p53. Ceci suggère donc que p53 joue un rôle activateur sur l'expression de la parkine, qui est inhibé par les mutations de Tp53.

J'ai confirmé ces résultats par deux approches :

En transfectant des cellules SH-SY5Y avec des constructions p53 sauvages ou présentant des mutations fréquentes dans les cancers (mutations 175 et 273). Si le p53 sauvage est capable d'augmenter l'expression de la parkine ainsi que l'activité de son promoteur, les deux formes mutées n'ont pas d'effet.

Dans des cellules MCF-7 qui expriment une forme sauvage et active ou une forme délétée et inactive de p53. L'expression de la parkine est là encore diminuée dans les cellules où p53 est inactif.

L'ensemble de ces résultats indique que p53 est capable, en condition physiologique, d'activer la transcription de la parkine, alors que les mutations de p53 conduisent à une perte de cette fonction.

Les délétions de p53 conduisent à une réduction de l'expression de la parkine dans des lignées cellulaires et des cerveaux de souris.

J'ai tout d'abord mesuré l'immunoréactivité de la parkine dans un modèle de cellules invalidées pour p53, les HCT116. L'invalidation de p53 conduit à une forte diminution de l'expression de la parkine. J'ai ensuite réalisé des expériences de mesures du niveau d'ARNm et de l'activité du promoteur dans des cellules MEF ARF^{-/-} et les MEF ARF^{-/-} p53^{-/-}. L'invalidation de p53 induit une forte diminution de ces deux paramètres. Si l'on complémente ces cellules avec du p53 sauvage, on récupère l'effet transcriptionnel sur la parkine.

Ces résultats ont été confirmés dans deux modèles *in vivo*.

L'immunoréactivité de la parkine est diminuée dans des extraits de cerveaux de souris invalidées pour p53.

La surexpression de p53 dans le cerveau de souris sauvage, via injection stéréotaxique d'adénovirus dans le striatum, conduit à une surexpression de la parkine.

Ces résultats démontrent clairement l'effet de l'invalidation de p53 sur l'expression de la parkine et montre que cette régulation est présente non seulement dans des lignées cellulaires mais également *in vivo* chez la souris.

p53 contrôle la transcription de la parkine via ses propriétés de fixation sur l'ADN.

L'ensemble des données présentées précédemment sur l'activité transcriptionnelle de p53 sur la parkine ne constitue que des preuves indirectes. En effet, bien que très solide, l'ensemble de ces éléments ne permettent pas de conclure à la fixation directe de p53 sur le promoteur de la parkine. Il a donc fallu mettre en évidence un site de fixation de p53. Par une étude *in silico*, nous

avons trouvé un site consensus de fixation de p53 sur la parkine. Nous avons réalisé la délétion de ce site et mesuré l'activation de ce promoteur délété par rapport à celle du promoteur sauvage lors d'une surexpression de p53. Cette surexpression n'a plus d'effet sur le promoteur muté. Ceci permet de conclure à la nécessité de cette séquence dans le rôle transcriptionnel de p53 sur la parkine.

Conclusion.

Dans cette étude j'ai montré que la parkine et p53 voient leur expression altérée dans les cas de gliomes, avec une forte baisse du niveau de parkine corrélée à la sévérité de la maladie alors que p53 au contraire augmente. De plus, cette étude montre clairement le rôle de p53 sur l'activation de la parkine, les mutations ou formes inactives de p53 conduisant à une baisse de l'expression de la parkine. Ces deux protéines sont impliquées dans une boucle de contrôle. En condition physiologique p53 active la transcription de la parkine qui en retour inhibe l'expression de p53. Dans les cancers, les mutations de p53 conduisent à une perte de contrôle et à une baisse de l'expression de la parkine qui ne peut ainsi plus jouer son rôle de suppresseur de tumeurs.

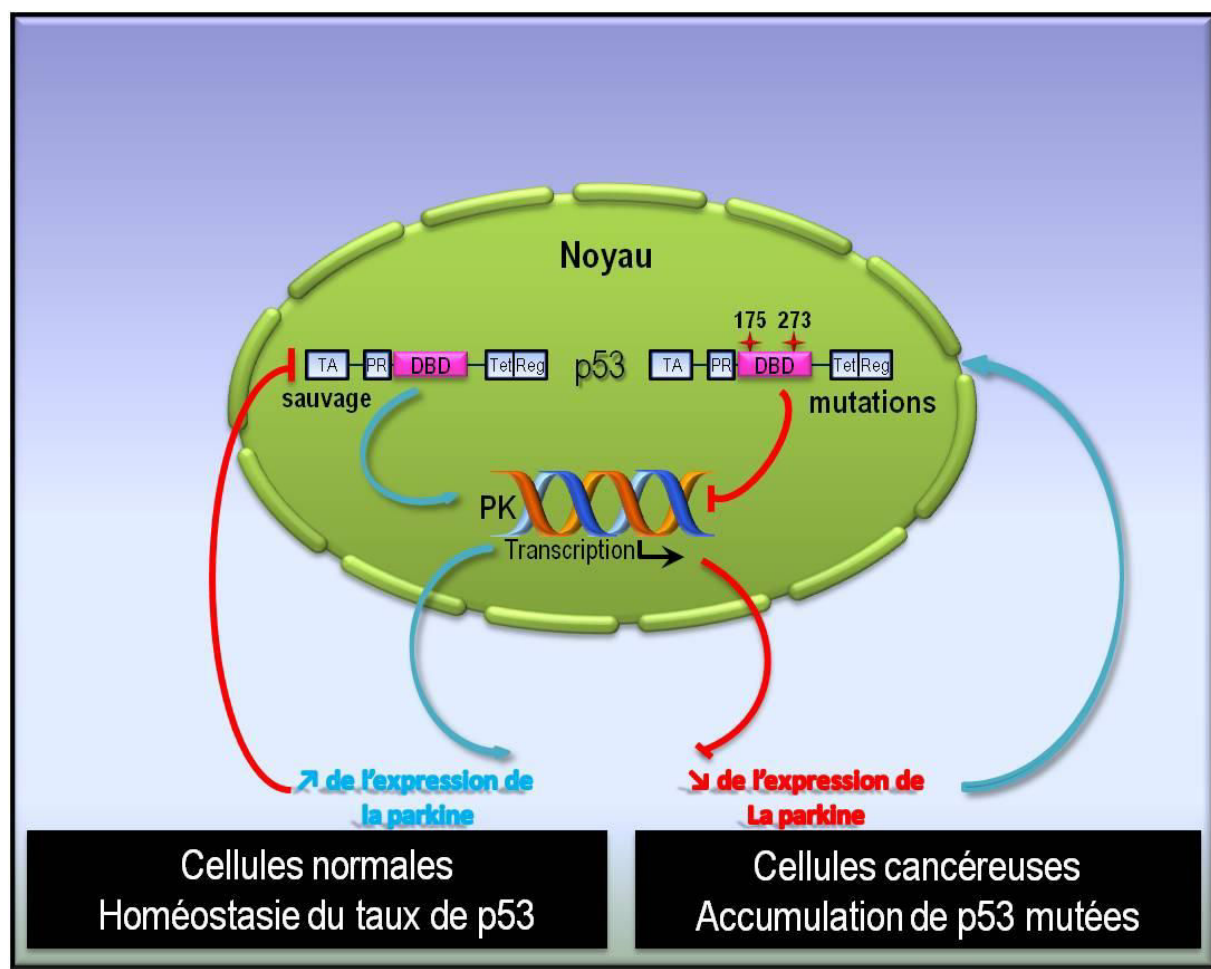


Figure 13: Schéma récapitulatif de la boucle de contrôle entre la parkine et p53 (d'après Viotti et al., 2014).

VII. Discussion

La parkine est une protéine jouant le rôle d'ubiquitine ligase de type E3. Elle est responsable du marquage et de la dégradation de nombreuses protéines par le système ubiquitine-protéasome. Sa perte de fonction est d'ailleurs associée à une accumulation de protéines, due à un mauvais fonctionnement du protéasome [328]. Ce rôle est crucial dans l'étiologie de la maladie de Parkinson, puisque les mutations de la parkine, connues pour inhiber cette fonction sont responsables de formes autosomales récessives de la maladie. Cependant, notre équipe a mis en évidence une nouvelle fonction de la parkine. En effet, elle est capable de réprimer la transcription de p53. Mon équipe a ainsi montré la directe interaction entre le domaine R1 de la parkine et le promoteur de p53. Il est d'ailleurs important de noter que cette fixation est abolie par l'utilisation de mutants de la parkine liés au rôle d'ubiquitine ligase ou non.

Régulation des présénilines 1 et 2 par la parkine.

Les présénilines 1 et 2 sont des membres du complexe γ -sécrétase, qui est, conjointement avec d'autres enzymes, responsable du clivage du précurseur β APP, entraînant par conséquence la production de peptide A β qui est le composé toxique majeur au cœur de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. La régulation de PS1 est d'ailleurs connue pour moduler directement l'activité de la γ -sécrétase. La parkine est quant à elle, surtout associée à la maladie de Parkinson. Mais il est connu qu'elle peut agir sur la régulation de l'A β et promouvoir sa clairance [329] ; le mécanisme sous-jacent était encore inconnu au début de mes travaux. Cette étude ne tenant pas compte de nos travaux sur l'activité transcriptionnelle de la parkine, c'est sous l'éclairage de ce nouveau rôle que nous avons étudié son effet transcriptionnel sur PS1 et PS2. Nos résultats montrent clairement que la parkine est capable d'augmenter PS1 et de diminuer PS2 au niveau de l'activité du promoteur et des niveaux d'ARNm et protéique, et ceux dans des modèles *ex vivo* et *in vivo*. Nos résultats dans des modèles invalidés pour p53 montrent que ces effets sont indépendants de p53. Ce contrôle est aboli par les mutations de la parkine qui inactivent ou pas l'activité ubiquitine ligase. Ce résultat est important et suggère que la parkine pourrait agir au niveau transcriptionnel. C'est ce que nous avons confirmé par des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine et de retard sur gel.

Nos résultats mettent en évidence que la parkine est donc capable de se fixer sur les promoteurs de PS1 et de PS2 et d'entraîner leurs activations et inactivations respectives. Nous avons montré que la parkine se fixe sur les promoteurs des PS via son domaine RING-IBR-RING, et pas seulement son domaine RING1 comme c'est le cas pour p53 [119]. Mais nous avons surtout découvert une séquence de sept nucléotides que l'on retrouve sur les promoteurs de p53, PS1 et PS2, dans les zones de fixation de la parkine, et dont la délétion abolit la transactivation. L'utilisation de sondes possédant cette séquence ou une forme mutée de celle-ci, confirme d'ailleurs que seules les formes sauvages de la parkine sont capables de s'y fixer, et que sa délétion réduit de manière extrêmement importante la fixation de la parkine, mais ne l'abolit pas totalement. Ceci suggère que cette séquence n'explique pas à elle seule l'intégralité du mécanisme de fixation. Cependant, la découverte de cette séquence est d'un intérêt fondamental dans la compréhension du rôle de la parkine en tant que facteur de transcription. Elle ouvre en effet la voie à une étude à plus grande échelle des cibles de la parkine notamment par des approches *in silico* ou de génomiques (puces à ADN, séquençage à haut débit après immunoprécipitation de la chromatine). L'augmentation du nombre de cibles validées permettra petit à petit d'affiner la séquence consensus et d'obtenir une matrice de poids fiable rendant compte de la réalité de la fixation de la parkine sur l'ADN.

D'un point de vue plus fonctionnel, la régulation de l'expression de PS1 et PS2 par la parkine ne reste pas sans effet.

Nous avons réalisé des tests *in vitro* de mesure de l'activité γ -sécrétase. Cette activité est régulée très finement et notamment par le niveau d'expression de PS1 [330]. Dans cette étude, nous montrons que la parkine augmente l'activité du complexe γ -sécrétase, ce qui correspond à l'effet activateur connu via PS1. Ceci pourrait avoir de nombreux effets dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. En effet, l'expression de la parkine est augmentée dans la pathologie et co-localisée avec des lésions vasculaires liées à A β [331]. Cependant, il y n'y a que peu d'augmentation de production d'A β dans les formes sporadiques de la pathologie, mais plutôt une diminution de la clairance. Bien qu'au cœur de la pathologie, le peptide A β n'est pas le seul produit de la coupure γ . L'AICD son corollaire intracellulaire est produit par un clivage lié à PS1 et peut agir comme facteur de transcription et activer de nombreux mécanismes conduisant à la mort cellulaire comme l'hyperphosphorylation de Tau [332], l'activation de p53 [264] et l'augmentation du ratio A β 40/42 [333]. Cependant, la γ -sécrétase est connue pour cliver près de 100 substrats différents et la parkine pourrait, en régulant les présénilines, favoriser le clivage de substrats impliqués dans une multitude de processus comme l'angiogenèse (VEGFR-1), la tumorigenèse (CD44), l'adhésion cellulaire (les cadhérines). Au travers des PS c'est donc l'ensemble de l'éventail de clivages assurés par la γ -sécrétase que régule la parkine. Cela ouvre donc la porte à de nouvelles perspectives pour comprendre le rôle de la parkine dans la maladie d'Alzheimer, mais également dans de nombreuses autres pathologies et notamment le cancer où le contrôle des mécanismes d'angiogenèse et d'adhésion est crucial. PS2 est connu pour activer l'apoptose [324]. Notre étude montre que la parkine possède un effet anti-apoptotique mesuré par l'activité de la caspase-3. En réduisant l'expression de PS2 elle inhibe l'apoptose.

Dans la perspective de futures études, il est également important de noter que la parkine peut agir aussi bien en temps qu'activateur que répresseur transcriptionnel. Cet état de fait n'est pas nouveau puisque c'est déjà le cas pour p53 [119], mais il est intéressant de remarquer que sur trois cibles transcriptionnelles, la parkine réprime deux protéines pro-apoptotiques (p53 et PS2) et active une protéine connue pour ces effets protecteurs. Ceci suggère l'existence d'une certaine adaptabilité du mécanisme et une grande finesse dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de la parkine. Comme décrit précédemment, les domaines de la parkine nécessaires à la fixation sont d'ailleurs plus vastes pour les présénilines que pour p53 ce qui suggère que la zone de contact pourrait moduler l'activité de facteurs de transcription, ou que des cofacteurs entre en jeu.

Régulation de DJ-1 par la parkine.

Dans cet article nous avons étudié le contrôle de DJ-1 par la parkine. Le stress du réticulum est un élément clé de la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Elle se caractérise par une accumulation importante de protéines qui conduisent à la formation d'agrégats toxiques. Ceci active le système de réponse au stress du réticulum endoplasmique. La parkine est connue pour répondre et prévenir les stress du réticulum induit par l'accumulation de protéines et notamment du récepteur Pael [117]. Ce rôle protecteur de la parkine dans le cadre du stress du réticulum est historiquement associé à sa fonction d'ubiquitine ligase de par sa contribution à la dégradation de protéines via le protéasome. Notre étude s'est donc concentrée sur le dialogue entre la parkine et DJ-1 en condition de stress du réticulum mais indépendamment de son rôle d'E3 ligase. DJ-1 est une protéine aux multiples rôles. Elle est principalement connue comme un antioxydant et une protéine chaperonne, et semble impliquée dans le contrôle du stress réticulaire [334]. Nos résultats indiquent que la parkine régule DJ-1 au niveau transcriptionnel indépendamment de son activité E3 ligase. p53 étant une cible transcriptionnelle de la parkine, nous avons étudié sa contribution dans ce mécanisme. Il apparaît qu'il joue le rôle d'intermédiaire entre la parkine et DJ-1, mais n'est pas capable d'activer directement le promoteur de DJ-1. Une

étude *in silico* nous a permis d'identifier un site de fixation pour XBP-1 sur le promoteur de DJ-1. XBP-1 est un facteur de transcription dont l'activation est liée à un épissage par IRE1. Il s'agit d'une endonucléase qui répond au stress du réticulum. XBP-1 est donc un puissant élément de réponse au stress protecteur contre des modèles de maladie de Parkinson induits par des toxines [335]. XBP-1 est ici capable d'activer la transcription de DJ-1 sous le contrôle de la parkine et de p53. Nous avons donc mis en évidence une voie de régulation entre la parkine et DJ-1 qui fait intervenir deux intermédiaires p53 et XBP-1. La parkine réprime l'expression de p53 qui réprime à son tour XBP-1 et qui active DJ-1.

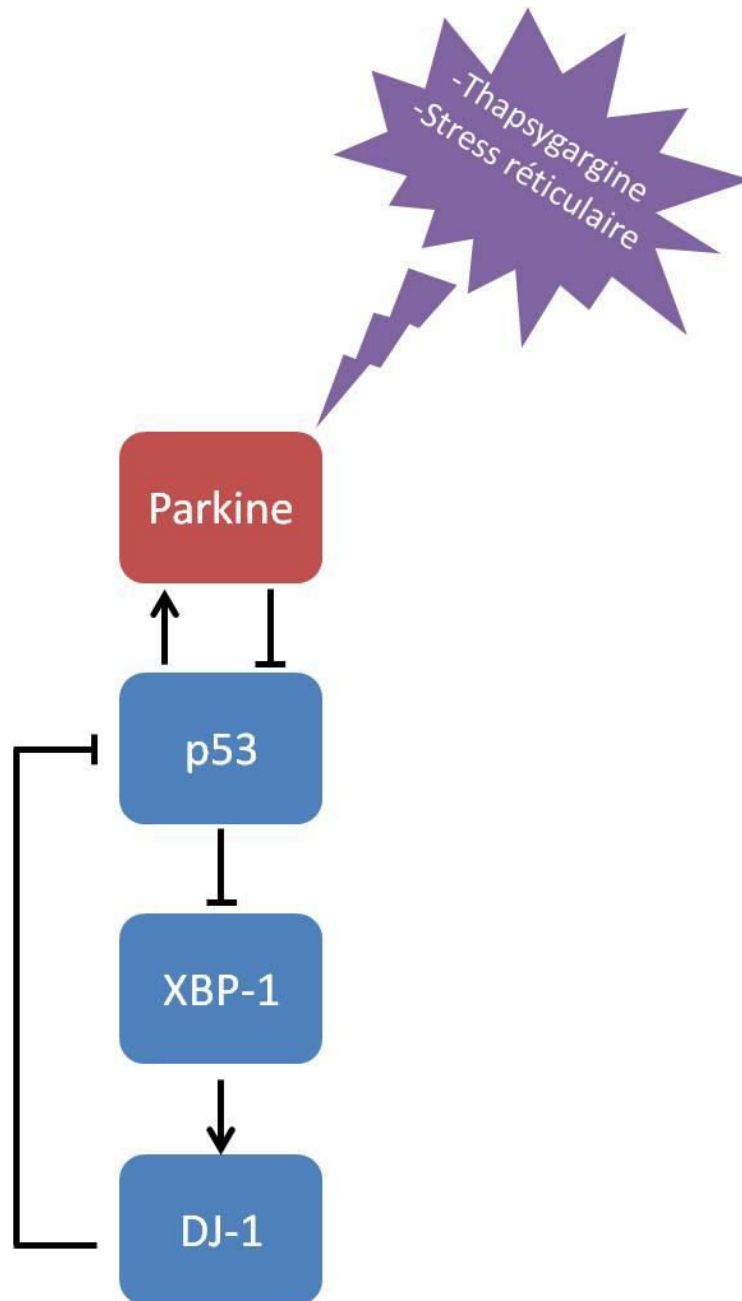


Figure 14: Cascade de régulation entre la parkine et DJ-1, d'après Duplan et coll. et Giaime et coll.

Cette étude lie la parkine et DJ-1 en réponse au stress du réticulum et montre que la parkine active l'expression de DJ-1. Dans une étude de 2005, Moore et coll. [72] montraient déjà que la parkine interagit physiquement avec DJ-1 et la stabilise. Ceci n'est pas en contradiction avec nos résultats, l'effet étant dans notre cas indirect ce qui suggère deux modes de contrôle par la parkine. De plus, notre étude ne se place pas uniquement dans le cadre des formes familiales de

la pathologie et du stress oxydatif, mais dans le cadre d'une réponse à un stress réticulaire, une voie d'apoptose particulière faisant intervenir notamment des chaperonnes pour contrer les effets des protéines mal repliées. Il convient donc d'envisager ce travail sous cet angle et ne pas oublier que DJ-1 est elle-même une chaperonne qui pourrait jouer un rôle actif pour lutter contre ces effets délétères dans les nombreuses pathologies qui font intervenir ce type de stress comme l'atrophie multi-systématisée ou encore les tauopathies. Il est d'ailleurs intéressant de noter que DJ-1 semble impliquée dans ces deux pathologies et qu'elle est retrouvée dans les dégénérescences neurofibrillaires [336] et que ses mutations conduisent à une hyperphosphorylation de Tau. De plus, une étude de mon équipe montre que DJ-1 est capable de diminuer l'expression de p53 et ainsi de contrer ces effets pro-apoptotiques [180]. Il existe donc une boucle de rétrocontrôle entre DJ-1 et p53. Ce travail est donc le second après l'étude de Yokota et coll. de 2003 à élargir le rôle de DJ-1 au stress réticulaire et non plus au seul stress oxydant. Ce travail renforce également l'hypothèse du rôle neuroprotecteur de la parkine puisqu'elle est capable, en condition de stress, de diminuer l'expression de p53 et surtout de promouvoir l'expression de DJ-1 qui est un neuroprotecteur puissant.

Rétrocontrôle de p53 sur la parkine et dialogue fonctionnel dans les gliomes.

p53 est un suppresseur de tumeur retrouvé muté dans près de 50% des tumeurs. Une des caractéristiques du développement tumoral est d'ailleurs l'accumulation de formes mutées de p53. Elle est due à la perte de son activité transcriptionnelle et donc son incapacité à contrôler sa propre dégradation notamment par le protéasome [140] via MDM2 [139]. La parkine est une protéine caractérisée dans les formes familiales de Parkinson. Cependant plusieurs études pointent son rôle le cancer. Son expression est altérée dans un grand nombre de tumeurs [301, 302] et une étude de 2011 a mis en évidence des mutations somatiques spécifiques de cette protéine dans des cas de gliomes [318]. Nous avons donc décidé d'étudier l'expression de p53 et de la parkine dans les gliomes. Nous avons observé une accumulation de p53 et une nette diminution de l'expression de la parkine. Dans les deux cas, l'expression de ces protéines pouvait être corrélée au grade de la tumeur mais également entre elles, et notamment dans les tumeurs où p53 est retrouvé muté. Nous avons donc émis l'hypothèse que la baisse d'expression de la parkine pourrait être liée à une perte de son activité transcriptionnelle. Pour cela nous avons étudié l'expression de deux cibles directes et indirectes de p53, Bax et BCL-2. L'expression de ces deux protéines a été corrélée au taux de p53 et l'altération de leurs expressions observées dans les biopsies confirme l'hypothèse d'une perte d'activité transcriptionnelle de p53. Nous avons confirmé ces résultats, tout d'abord en vérifiant la présence de mutation de p53 dans notre cohorte d'échantillons. En fonction du grade du cancer, nous avons trouvé entre 20% et 50% des échantillons. D'après une base de données, l'ensemble de ces mutations inactivent p53. J'ai confirmé ces résultats dans des lignées de gliomes où p53 est muté et inactif, l'expression de p53 augmente alors que celle de la parkine baisse. Des expériences dans des modèles de surexpression et d'inactivation de p53 ont montré que des formes sauvages peuvent conduire à une activation de l'expression de la parkine qui est abolie par l'utilisation de forme mutées. Enfin, j'ai trouvé un site de fixation potentiel de p53 sur le promoteur de la parkine. La mutation de ce site entraîne la perte de l'activation transcriptionnelle de p53.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence une altération de l'expression de la parkine dans les gliomes et surtout, de comprendre le mécanisme derrière cette altération. Il apparaît qu'en condition pathologique, quand p53 est muté dans les cancers, il perd sa capacité à activer la transcription de la parkine ce qui conduit à la baisse de son expression. Cet effet est à mettre en parallèle avec la capacité de la parkine à inhiber transcriptionnellement l'expression de p53. Nous voyons ainsi se dessiner une boucle de contrôle entre la parkine et p53 qui permet de garantir une homéostasie d'expression en condition physiologique. Toutefois, en condition

pathologique des mutations de la parkine (comme c'est le cas dans la maladie de Parkinson) conduisent à une levée d'inhibition sur le gène p53 et à un phénotype pro-apoptotique. Dans les cancers, les mutations de p53 conduisent à la perte du tonus activateur sur l'expression de la parkine et à la perte de son activité protectrice pour la cellule. Cette baisse d'expression est à mettre en parallèle avec la fonction suppresseur de tumeur de la parkine. Il est tout à fait concevable de voir l'expression d'un suppresseur de tumeur décroître dans les cancers. Cependant, il est important de se souvenir que la parkine est également connue pour son rôle anti-apoptotique. Ce fait est paradoxal, puisqu'un suppresseur de tumeur est généralement pro-apoptotique de manière à bloquer la prolifération des cellules. Une hypothèse pour expliquer cette particularité est de considérer que la parkine possède une action tissu-spécifique. Ainsi dans les neurones post mitotiques, la parkine aurait un effet plutôt pro-apoptotique, alors que dans d'autres types de cellules, elle aura un rôle anti-apoptotique. Ce domaine est sujet à de nombreuses controverses. Ainsi le rôle de la parkine sur la prolifération reste lui aussi obscur. Veeriah et coll., indiquent une régulation négative de la cycline E par la parkine [318], tandis que Calvin CW Yeo et coll., observent une absence d'effet [118]. Comme nous le voyons, le rôle précis de la parkine dans l'apoptose et la prolifération reste encore trouble. Nous savons également depuis 2009, que la parkine n'est pas simplement une ubiquitine ligase mais également un facteur de transcription. Il est également envisageable que les différentes fonctions soient régulées différemment et conduisent à des réactions cellulaires opposées. La découverte de cette boucle de contrôle constitue un point important dans la compréhension du rôle physiologique de la parkine et ouvre de nouvelles perspectives pour de futures études.

Conclusions et perspectives.

Ce projet prend place dans le cadre vaste de l'étude croisée des maladies neurodégénératives et des cancers. Il contribue à placer au centre d'un vaste réseau de régulation la parkine, qui semble agir comme un nœud de régulation entre fonctions protectrices et toxiques dans la cellule. Nous avons montré que la parkine est un effecteur clé de la régulation du stress cellulaire, notamment via son dialogue avec p53, et son effet sur DJ-1. Nous avons également apporté des éléments importants qui soutiennent le rôle protecteur et anti-apoptotique de la parkine.

Cette étude est à replacer également parmi d'autres qui cherchent, non pas à étudier les pathologies de manières fermées et en vase clos, mais au contraire à construire des ponts entre elles. En effet, si historiquement le découpage entre pathologies s'est fait autour de symptômes communs, nous voyons bien aujourd'hui que de nombreux dénominateurs communs peuvent exister aux niveaux moléculaires et cellulaires.

Il convient maintenant de poursuivre l'étude de la fonction physiologique de la parkine. De par son rôle dual d'ubiquitine ligase et de facteur de transcription, de nombreuses perspectives sont ouvertes. J'ai ainsi initié au laboratoire un projet sur le rôle de la parkine dans le mécanisme de gliomagenèse. Pour cela j'ai ciblé certaines des fonctions classiquement altérées dans la transformation des cellules en cellules tumorales. Mes premiers résultats indiquent que la parkine peut réguler l'expression des cadhérines et ceux par un mécanisme transcriptionnel. Ce sont des protéines responsables de l'adhésion cellulaire via la formation de jonctions adhérentes. Elles sont ainsi responsables de la cohésion tissulaire et leurs expressions sont fréquemment altérées dans les cancers facilitant le développement tumoral et le phénomène de métastase. Nous avons également au sein du laboratoire poursuivi l'étude de la fonction transcriptionnelle de la parkine et plus particulièrement la recherche de cibles potentielles. Outre les cadhérines nous avons identifié d'autres cibles potentielles de la parkine impliquées dans différentes fonctions comme l'angiogenèse, la prolifération, le vieillissement, ou encore la tumorigenèse. L'étape suivante est donc d'étudier ces cibles de manière à confirmer l'effet de la parkine. La tâche sera

rendue difficile au début par le peu de cibles déjà validées et donc l'incertitude relative de notre séquence consensus. Cependant, la découverte d'autres cibles permettra d'obtenir une matrice de poids beaucoup plus pertinente pour l'étude du génome entier.

Ces éléments sont encourageants et rendent l'utilisation de la parkine comme cible thérapeutique très prometteuse. A l'heure actuelle, les connaissances sur le rôle précis de la parkine dans le maintien de l'homéostasie cellulaire sont trop lacunaires pour permettre une utilisation thérapeutique sans danger. Mais les projets de ce type, s'ils se multiplient, pourraient dresser un tableau des voies et des mécanismes où elle est impliquée suffisamment précis pour envisager le développement de médicaments. Cependant, nous avons montré que la parkine voit son expression corrélée au grade du cancer. Il est donc possible de s'en servir comme outil de diagnostic. En effet, il est à l'heure actuelle toujours difficile de poser un diagnostic fiable à propos du grade d'un gliome et il repose principalement sur l'appréciation subjective du médecin qui effectue une analyse en se basant sur des critères histologiques. La parkine, conjointement à d'autres marqueurs, pourrait entrer dans la composition d'une cartographie moléculaire des tumeurs permettant, soit de confirmer la classification histologique actuelle, soit de l'affiner voire de la remplacer.

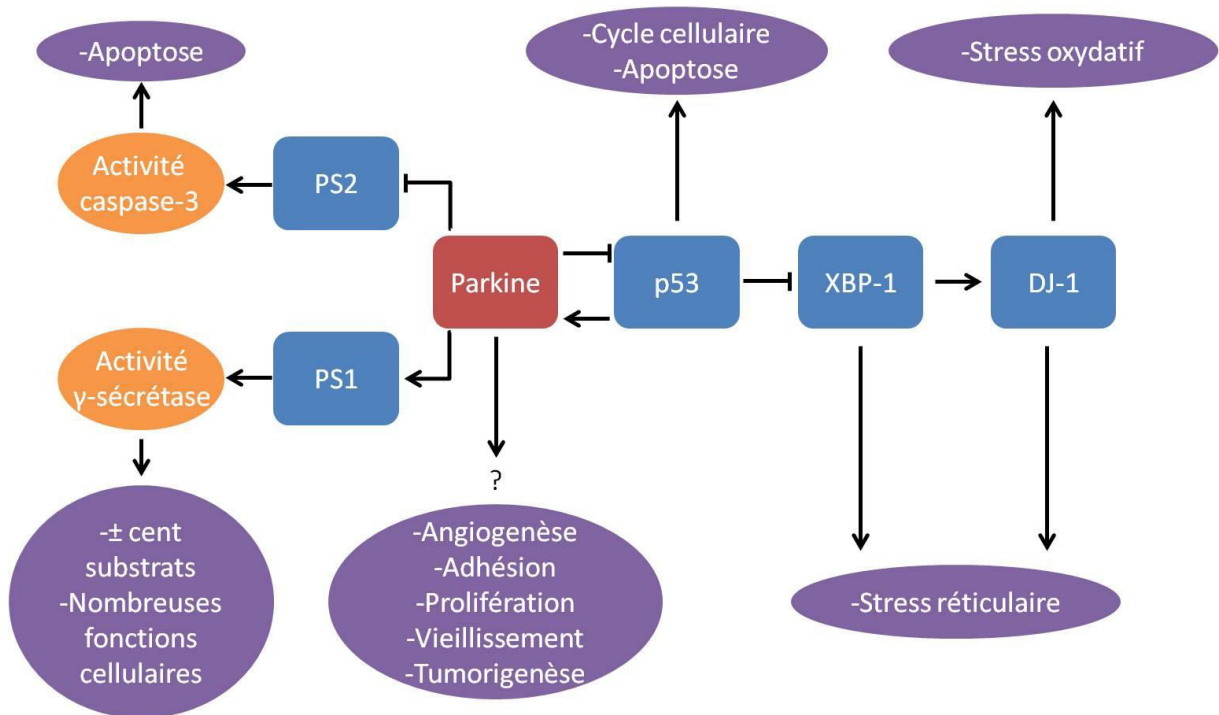


Figure 15: Modèle représentant l'ensemble des cibles de la parkine étudiées dans ce manuscrit et les implications fonctionnelles de ces contrôles.

VIII. Références bibliographiques.

1. HOEHN, M.M. AND M.D. YAHR, *PARKINSONISM: ONSET, PROGRESSION AND MORTALITY*. NEUROLOGY, 1967. 17(5): p. 427-42.
2. REMY, P., ET AL., *DEPRESSION IN PARKINSON'S DISEASE: LOSS OF DOPAMINE AND NORADRENALINE INNERVATION IN THE LIMBIC SYSTEM*. BRAIN, 2005. 128(Pt 6): p. 1314-22.
3. AARSLAND, D., ET AL., *THE EFFECT OF AGE OF ONSET OF PD ON RISK OF DEMENTIA*. J NEUROL, 2007. 254(1): p. 38-45.
4. KAPP, W., *THE HISTORY OF DRUGS FOR THE TREATMENT OF PARKINSON'S DISEASE*. J NEURAL TRANSM SUPPL, 1992. 38: p. 1-6.
5. LEENDERS, K.L., ET AL., *THE NIGROSTRIATAL DOPAMINERGIC SYSTEM ASSESSED IN VIVO BY POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY IN HEALTHY VOLUNTEER SUBJECTS AND PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE*. ARCH NEUROL, 1990. 47(12): p. 1290-8.
6. MANN, D.M., P.O. YATES, AND J. HAWKES, *THE PATHOLOGY OF THE HUMAN LOCUS CERULEUS*. CLIN NEUROPATHOL, 1983. 2(1): p. 1-7.
7. AGID, Y., ET AL., *THE EFFICACY OF LEVODOPA TREATMENT DECLINES IN THE COURSE OF PARKINSON'S DISEASE: DO NONDOPAMINERGIC LESIONS PLAY A ROLE?* ADV NEUROL, 1990. 53: p. 83-100.
8. HOLDORFF, B., A.M. RODRIGUES E SILVA, AND R. DODEL, *CENTENARY OF LEWY BODIES (1912-2012)*. J NEURAL TRANSM, 2013. 120(4): p. 509-16.
9. SPILLANTINI, M.G., ET AL., *ALPHA-SYNUCLEIN IN FILAMENTOUS INCLUSIONS OF LEWY BODIES FROM PARKINSON'S DISEASE AND DEMENTIA WITH LEWY BODIES*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1998. 95(11): p. 6469-73.
10. GANDHI, S., ET AL., *PINK1 PROTEIN IN NORMAL HUMAN BRAIN AND PARKINSON'S DISEASE*. BRAIN, 2006. 129(Pt 7): p. 1720-31.
11. LOWE, J., ET AL., *UBIQUITIN CARBOXYL-TERMINAL HYDROLASE (PGP 9.5) IS SELECTIVELY PRESENT IN UBIQUITINATED INCLUSION BODIES CHARACTERISTIC OF HUMAN NEURODEGENERATIVE DISEASES*. J PATHOL, 1990. 161(2): p. 153-60.
12. SCHLOSSMACHER, M.G., ET AL., *PARKIN LOCALIZES TO THE LEWY BODIES OF PARKINSON DISEASE AND DEMENTIA WITH LEWY BODIES*. AM J PATHOL, 2002. 160(5): p. 1655-67.
13. BANDOPADHYAY, R., ET AL., *THE EXPRESSION OF DJ-1 (PARK7) IN NORMAL HUMAN CNS AND IDIOPATHIC PARKINSON'S DISEASE*. BRAIN, 2004. 127(Pt 2): p. 420-30.
14. MIKLOSSY, J., ET AL., *LRRK2 EXPRESSION IN NORMAL AND PATHOLOGIC HUMAN BRAIN AND IN HUMAN CELL LINES*. J NEUROPATHOL EXP NEUROL, 2006. 65(10): p. 953-63.
15. BRAAK, H., ET AL., *STAGING OF BRAIN PATHOLOGY RELATED TO SPORADIC PARKINSON'S DISEASE*. NEUROBIOL AGING, 2003. 24(2): p. 197-211.
16. BRAAK, H., U. RUB, AND K. DEL TREDICI, *COGNITIVE DECLINE CORRELATES WITH NEUROPATHOLOGICAL STAGE IN PARKINSON'S DISEASE*. J NEUROL SCI, 2006. 248(1-2): p. 255-8.
17. GOUIDER-KHOUBA, N., ET AL., *AUTOSOMAL RECESSIVE PARKINSONISM LINKED TO PARKIN GENE IN A TUNISIAN FAMILY. CLINICAL, GENETIC AND PATHOLOGICAL STUDY*. PARKINSONISM RELAT DISORD, 2003. 9(5): p. 247-51.
18. HAYASHI, S., ET AL., *AN AUTOPSY CASE OF AUTOSOMAL-RECESSIVE JUVENILE PARKINSONISM WITH A HOMOZYGOUS EXON 4 DELETION IN THE PARKIN GENE*. MOV DISORD, 2000. 15(5): p. 884-8.
19. FARRER, M., ET AL., *LEWY BODIES AND PARKINSONISM IN FAMILIES WITH PARKIN MUTATIONS*. ANN NEUROL, 2001. 50(3): p. 293-300.
20. PRAMSTALLER, P.P., ET AL., *LEWY BODY PARKINSON'S DISEASE IN A LARGE PEDIGREE WITH 77 PARKIN MUTATION CARRIERS*. ANN NEUROL, 2005. 58(3): p. 411-22.
21. SHARP, M.E., ET AL., *PARKINSON'S DISEASE WITH LEWY BODIES ASSOCIATED WITH A HETEROZYGOUS PARKIN DOSAGE MUTATION*. MOV DISORD, 2014. 29(4): p. 566-8.
22. GREFFARD, S., ET AL., *A STABLE PROPORTION OF LEWY BODY BEARING NEURONS IN THE SUBSTANTIA NIGRA SUGGESTS A MODEL IN WHICH THE LEWY BODY CAUSES NEURONAL DEATH*. NEUROBIOL AGING, 2010. 31(1): p. 99-103.
23. MIZUNO, Y., ET AL., *DEFICIENCIES IN COMPLEX I SUBUNITS OF THE RESPIRATORY CHAIN IN PARKINSON'S DISEASE*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 1989. 163(3): p. 1450-5.
24. SCHAPIRA, A.H., ET AL., *ANATOMIC AND DISEASE SPECIFICITY OF NADH CoQ1 REDUCTASE (COMPLEX I) DEFICIENCY IN PARKINSON'S DISEASE*. J NEUROCHEM, 1990. 55(6): p. 2142-5.
25. BENECKE, R., P. STRUMPER, AND H. WEISS, *ELECTRON TRANSFER COMPLEXES I AND IV OF PLATELETS ARE ABNORMAL IN PARKINSON'S DISEASE BUT NORMAL IN PARKINSON-PLUS SYNDROMES*. BRAIN, 1993. 116 (Pt 6): p. 1451-63.
26. MANN, V.M., ET AL., *BRAIN, SKELETAL MUSCLE AND PLATELET HOMOGENATE MITOCHONDRIAL FUNCTION IN PARKINSON'S DISEASE*. BRAIN, 1992. 115 (Pt 2): p. 333-42.
27. BENDER, A., ET AL., *HIGH LEVELS OF MITOCHONDRIAL DNA DELETIONS IN SUBSTANTIA NIGRA NEURONS IN AGING AND PARKINSON DISEASE*. NAT GENET, 2006. 38(5): p. 515-7.
28. KRATTSBERG, Y., ET AL., *MITOCHONDRIAL DNA DELETIONS ARE ABUNDANT AND CAUSE FUNCTIONAL IMPAIRMENT IN AGED HUMAN SUBSTANTIA NIGRA NEURONS*. NAT GENET, 2006. 38(5): p. 518-20.
29. SCHAPIRA, A.H., *MITOCHONDRIA IN THE AETIOLOGY AND PATHOGENESIS OF PARKINSON'S DISEASE*. LANCET NEUROL, 2008. 7(1): p. 97-109.

30. CADENAS, E., ET AL., *PRODUCTION OF SUPEROXIDE RADICALS AND HYDROGEN PEROXIDE BY NADH-UBIQUINONE REDUCTASE AND UBIQUINOL-CYTOCHROME C REDUCTASE FROM BEEF-HEART MITOCHONDRIA*. ARCH BIOCHEM BIOPHYS, 1977. 180(2): p. 248-57.
31. ZHANG, J., ET AL., *PARKINSON'S DISEASE IS ASSOCIATED WITH OXIDATIVE DAMAGE TO CYTOPLASMIC DNA AND RNA IN SUBSTANTIA NIGRA NEURONS*. AM J PATHOL, 1999. 154(5): p. 1423-9.
32. DEXTER, D., ET AL., *LIPID PEROXIDATION AS CAUSE OF NIGRAL CELL DEATH IN PARKINSON'S DISEASE*. LANCET, 1986. 2(8507): p. 639-40.
33. PERIER, C., ET AL., *COMPLEX I DEFICIENCY PRIMES BAX-DEPENDENT NEURONAL APOPTOSIS THROUGH MITOCHONDRIAL OXIDATIVE DAMAGE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2005. 102(52): p. 19126-31.
34. SZABO, I., ET AL., *DISULFIDE BOND REARRANGEMENT DURING REGIOSELECTIVE OXIDATION IN PhS(O)Ph/CH₃SiCl₃ MIXTURE FOR THE SYNTHESIS OF ALPHA-CONOTOXIN GI*. BIOPOLYMERS, 2007. 88(1): p. 20-8.
35. HERSHKO, A. AND A. CIECHANOVER, *THE UBIQUITIN SYSTEM*. ANNU REV BIOCHEM, 1998. 67: p. 425-79.
36. HERSHKO, A., *LESSONS FROM THE DISCOVERY OF THE UBIQUITIN SYSTEM*. TRENDS BIOCHEM SCI, 1996. 21(11): p. 445-9.
37. VARSHAVSKY, A., *THE UBIQUITIN SYSTEM*. TRENDS BIOCHEM SCI, 1997. 22(10): p. 383-7.
38. KUZUHARA, S., ET AL., *LEWY BODIES ARE UBIQUITINATED. A LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY*. ACTA NEUROPATHOL, 1988. 75(4): p. 345-53.
39. LENNOX, G., ET AL., *ANTI-UBIQUITIN IMMUNOCYTOCHEMISTRY IS MORE SENSITIVE THAN CONVENTIONAL TECHNIQUES IN THE DETECTION OF DIFFUSE LEWY BODY DISEASE*. J NEUROL NEUROSURG PSYCHIATRY, 1989. 52(1): p. 67-71.
40. LOWE, J., ET AL., *UBIQUITIN IS A COMMON FACTOR IN INTERMEDIATE FILAMENT INCLUSION BODIES OF DIVERSE TYPE IN MAN, INCLUDING THOSE OF PARKINSON'S DISEASE, PICK'S DISEASE, AND ALZHEIMER'S DISEASE, AS WELL AS ROSENTHAL FIBRES IN CEREBELLAR ASTROCYTOMAS, CYTOPLASMIC BODIES IN MUSCLE, AND MALLORY BODIES IN ALCOHOLIC LIVER DISEASE*. J PATHOL, 1988. 155(1): p. 9-15.
41. MATSUI, H., ET AL., *PROTEASOME INHIBITION IN MEDAKA BRAIN INDUCES THE FEATURES OF PARKINSON'S DISEASE*. J NEUROCHEM, 2010. 115(1): p. 178-87.
42. MCNAUGHT, K.S., ET AL., *ALTERED PROTEASOMAL FUNCTION IN SPORADIC PARKINSON'S DISEASE*. EXP NEUROL, 2003. 179(1): p. 38-46.
43. MCNAUGHT, K.S., ET AL., *PROTEASOME INHIBITION CAUSES NIGRAL DEGENERATION WITH INCLUSION BODIES IN RATS*. NEUROREPORT, 2002. 13(11): p. 1437-41.
44. ALVES DA COSTA, C., ET AL., *6-HYDROXYDOPAMINE BUT NOT 1-METHYL-4-PHENYLPYRIDINIUM ABOLISHES ALPHA-SYNUCLEIN ANTI-APOPTOTIC PHENOTYPE BY INHIBITING ITS PROTEASOMAL DEGRADATION AND BY PROMOTING ITS AGGREGATION*. J BIOL CHEM, 2006. 281(14): p. 9824-31.
45. BLANDINI, F., ET AL., *PERIPHERAL PROTEASOME AND CASPASE ACTIVITY IN PARKINSON DISEASE AND ALZHEIMER DISEASE*. NEUROLOGY, 2006. 66(4): p. 529-34.
46. ANCOLIO, K., ET AL., *ALPHA-SYNUCLEIN AND THE PARKINSON'S DISEASE-RELATED MUTANT ALA53THR-ALPHA-SYNUCLEIN DO NOT UNDERGO PROTEASOMAL DEGRADATION IN HEK293 AND NEURONAL CELLS*. NEUROSCI LETT, 2000. 285(2): p. 79-82.
47. LANGSTON, J.W., ET AL., *CHRONIC PARKINSONISM IN HUMANS DUE TO A PRODUCT OF MEPERIDINE-ANALOG SYNTHESIS*. SCIENCE, 1983. 219(4587): p. 979-80.
48. LANGSTON, J.W. AND P. BALLARD, *PARKINSONISM INDUCED BY 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE (MPTP): IMPLICATIONS FOR TREATMENT AND THE PATHOGENESIS OF PARKINSON'S DISEASE*. CAN J NEUROL SCI, 1984. 11(1 SUPPL): p. 160-5.
49. BERRY, C., C. LA VECCHIA, AND P. NICOTERA, *PARAQUAT AND PARKINSON'S DISEASE. CELL DEATH DIFFER*, 2010. 17(7): p. 1115-25.
50. BONIFATI, V., ET AL., *AUTOSOMAL RECESSIVE EARLY ONSET PARKINSONISM IS LINKED TO THREE LOCI: PARK2, PARK6, AND PARK7*. NEUROL SCI, 2002. 23 SUPPL 2: p. S59-60.
51. BONIFATI, V., ET AL., *MUTATIONS IN THE DJ-1 GENE ASSOCIATED WITH AUTOSOMAL RECESSIVE EARLY-ONSET PARKINSONISM*. SCIENCE, 2003. 299(5604): p. 256-9.
52. ABOU-SLEIMAN, P.M., D.G. HEALY, AND N.W. WOOD, *CAUSES OF PARKINSON'S DISEASE: GENETICS OF DJ-1*. CELL TISSUE RES, 2004. 318(1): p. 185-8.
53. NAGAKUBO, D., ET AL., *DJ-1, A NOVEL ONCOGENE WHICH TRANSFORMS MOUSE NIH3T3 CELLS IN COOPERATION WITH RAS*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 1997. 231(2): p. 509-13.
54. ZHANG, L., ET AL., *MITOCHONDRIAL LOCALIZATION OF THE PARKINSON'S DISEASE RELATED PROTEIN DJ-1: IMPLICATIONS FOR PATHOGENESIS*. HUM MOL GENET, 2005. 14(14): p. 2063-73.
55. RIZZU, P., ET AL., *DJ-1 COLOCALIZES WITH TAU INCLUSIONS: A LINK BETWEEN PARKINSONISM AND DEMENTIA*. ANN NEUROL, 2004. 55(1): p. 113-8.
56. VAN HORSSSEN, J., ET AL., *Nrf2 AND DJ1 ARE CONSISTENTLY UPREGULATED IN INFLAMMATORY MULTIPLE SCLEROSIS LESIONS*. FREE RADIC BIOL MED, 2010. 49(8): p. 1283-9.
57. HONBOU, K., ET AL., *THE CRYSTAL STRUCTURE OF DJ-1, A PROTEIN RELATED TO MALE FERTILITY AND PARKINSON'S DISEASE*. J BIOL CHEM, 2003. 278(33): p. 31380-4.
58. LEE, S.J., ET AL., *CRYSTAL STRUCTURES OF HUMAN DJ-1 AND ESCHERICHIA COLI HSP31, WHICH SHARE AN EVOLUTIONARILY CONSERVED DOMAIN*. J BIOL CHEM, 2003. 278(45): p. 44552-9.
59. TAO, X. AND L. TONG, *CRYSTAL STRUCTURE OF HUMAN DJ-1, A PROTEIN ASSOCIATED WITH EARLY ONSET PARKINSON'S DISEASE*. J BIOL CHEM, 2003. 278(33): p. 31372-9.
60. WILSON, M.A., ET AL., *THE 1.1-A RESOLUTION CRYSTAL STRUCTURE OF DJ-1, THE PROTEIN MUTATED IN AUTOSOMAL RECESSIVE EARLY ONSET PARKINSON'S DISEASE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2003. 100(16): p. 9256-61.

61. MOORE, D.J., ET AL., *A MISSENSE MUTATION (L166P) IN DJ-1, LINKED TO FAMILIAL PARKINSON'S DISEASE, CONFERS REDUCED PROTEIN STABILITY AND IMPAIRS HOMO-OLIGOMERIZATION.* J NEUROCHEM, 2003. 87(6): p. 1558-67.
62. CANET-AVILES, R.M., ET AL., *THE PARKINSON'S DISEASE PROTEIN DJ-1 IS NEUROPROTECTIVE DUE TO CYSTEINE-SULFINIC ACID-DRIVEN MITOCHONDRIAL LOCALIZATION.* PROC NATL ACAD SCI U S A, 2004. 101(24): p. 9103-8.
63. MARTINAT, C., ET AL., *SENSITIVITY TO OXIDATIVE STRESS IN DJ-1-DEFICIENT DOPAMINE NEURONS: AN ES- DERIVED CELL MODEL OF PRIMARY PARKINSONISM.* PLoS Biol, 2004. 2(11): p. E327.
64. BLACKINTON, J., ET AL., *FORMATION OF A STABILIZED CYSTEINE SULFINIC ACID IS CRITICAL FOR THE MITOCHONDRIAL FUNCTION OF THE PARKINSONISM PROTEIN DJ-1.* J BIOL CHEM, 2009. 284(10): p. 6476-85.
65. ANDRES-MATEOS, E., ET AL., *DJ-1 GENE DELETION REVEALS THAT DJ-1 IS AN ATYPICAL PEROXIREDOXIN-LIKE PEROXIDASE.* PROC NATL ACAD SCI U S A, 2007. 104(37): p. 14807-12.
66. TAIRA, T., ET AL., *DJ-1 HAS A ROLE IN ANTIOXIDATIVE STRESS TO PREVENT CELL DEATH.* EMBO REP, 2004. 5(2): p. 213-8.
67. GAUTIER, V., ET AL., *YajL, THE PROKARYOTIC HOMOLOG OF THE PARKINSONISM-ASSOCIATED PROTEIN DJ-1, PROTECTS CELLS AGAINST PROTEIN SULFENYLATION.* J Mol Biol, 2012. 421(4-5): p. 662-70.
68. SHENDELMAN, S., ET AL., *DJ-1 IS A REDOX-DEPENDENT MOLECULAR CHAPERONE THAT INHIBITS ALPHA-SYNUCLEIN AGGREGATE FORMATION.* PLoS Biol, 2004. 2(11): p. E362.
69. DEKKER, M.C., ET AL., *A CLINICAL-GENETIC STUDY OF PARKINSON'S DISEASE IN A GENETICALLY ISOLATED COMMUNITY.* J NEUROL, 2003. 250(9): p. 1056-62.
70. DEKKER, M.C., ET AL., *BRACHYDACTYLY AND SHORT STATURE IN A KINDRED WITH EARLY-ONSET PARKINSONISM.* AM J MED GENET A, 2004. 130A(1): p. 102-4.
71. NURAL, H., ET AL., *DISSEMBLED DJ-1 HIGH MOLECULAR WEIGHT COMPLEX IN CORTEX MITOCHONDRIA FROM PARKINSON'S DISEASE PATIENTS.* MOL NEURODEGENER, 2009. 4: p. 23.
72. MOORE, D.J., ET AL., *ASSOCIATION OF DJ-1 AND PARKIN MEDIATED BY PATHOGENIC DJ-1 MUTATIONS AND OXIDATIVE STRESS.* HUM MOL GENET, 2005. 14(1): p. 71-84.
73. MILLER, D.W., ET AL., *L166P MUTANT DJ-1, CAUSATIVE FOR RECESSIVE PARKINSON'S DISEASE, IS DEGRADED THROUGH THE UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM.* J BIOL CHEM, 2003. 278(38): p. 36588-95.
74. OLZMANN, J.A., ET AL., *FAMILIAL PARKINSON'S DISEASE-ASSOCIATED L166P MUTATION DISRUPTS DJ-1 PROTEIN FOLDING AND FUNCTION.* J BIOL CHEM, 2004. 279(9): p. 8506-15.
75. XU, J., ET AL., *THE PARKINSON'S DISEASE-ASSOCIATED DJ-1 PROTEIN IS A TRANSCRIPTIONAL CO-ACTIVATOR THAT PROTECTS AGAINST NEURONAL APOPTOSIS.* HUM MOL GENET, 2005. 14(9): p. 1231-41.
76. KITADA, T., ET AL., *MUTATIONS IN THE PARKIN GENE CAUSE AUTOSOMAL RECESSIVE JUVENILE PARKINSONISM.* NATURE, 1998. 392(6676): p. 605-8.
77. HUYNH, D.P., ET AL., *PARKIN IS ASSOCIATED WITH ACTIN FILAMENTS IN NEURONAL AND NONNEURAL CELLS.* ANN NEUROL, 2000. 48(5): p. 737-44.
78. ZARATE-LAGUNES, M., ET AL., *PARKIN IMMUNOREACTIVITY IN THE BRAIN OF HUMAN AND NON-HUMAN PRIMATES: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS IN NORMAL CONDITIONS AND IN PARKINSONIAN SYNDROMES.* J COMP NEUROL, 2001. 432(2): p. 184-96.
79. HOROWITZ, J.M., ET AL., *IMMUNODETECTION OF PARKIN PROTEIN IN VERTEBRATE AND INVERTEBRATE BRAINS: A COMPARATIVE STUDY USING SPECIFIC ANTIBODIES.* J CHEM NEUROANAT, 2001. 21(1): p. 75-93.
80. SHIMURA, H., ET AL., *IMMUNOHISTOCHEMICAL AND SUBCELLULAR LOCALIZATION OF PARKIN PROTEIN: ABSENCE OF PROTEIN IN AUTOSOMAL RECESSIVE JUVENILE PARKINSONISM PATIENTS.* ANN NEUROL, 1999. 45(5): p. 668-72.
81. BEKRIS, L.M., I.F. MATA, AND C.P. ZABETIAN, *THE GENETICS OF PARKINSON DISEASE.* J GERIATR PSYCHIATRY NEUROL, 2010. 23(4): p. 228-42.
82. HRISTOVA, V.A., ET AL., *IDENTIFICATION OF A NOVEL Zn²⁺-BINDING DOMAIN IN THE AUTOSOMAL RECESSIVE JUVENILE PARKINSON-RELATED E3 LIGASE PARKIN.* J BIOL CHEM, 2009. 284(22): p. 14978-86.
83. WENZEL, D.M., ET AL., *UBCH7 REACTIVITY PROFILE REVEALS PARKIN AND HHARI TO BE RING/HECT HYBRIDS.* NATURE. 474(7349): p. 105-8.
84. RANKIN, C.A., ET AL., *PARKIN, A TOP LEVEL MANAGER IN THE CELL'S SANITATION DEPARTMENT.* OPEN BIOCHEM J, 2011. 5: p. 9-26.
85. HAMPE, C., ET AL., *BIOCHEMICAL ANALYSIS OF PARKINSON'S DISEASE-CAUSING VARIANTS OF PARKIN, AN E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE WITH MONOUBIQUITYLATION CAPACITY.* HUM MOL GENET, 2006. 15(13): p. 2059-75.
86. MATSUDA, N., ET AL., *DIVERSE EFFECTS OF PATHOGENIC MUTATIONS OF PARKIN THAT CATALYZE MULTIPLE MONOUBIQUITYLATION IN VITRO.* J BIOL CHEM, 2006. 281(6): p. 3204-9.
87. DOSS-PEPE, E.W., L. CHEN, AND K. MADURA, *ALPHA-SYNUCLEIN AND PARKIN CONTRIBUTE TO THE ASSEMBLY OF UBIQUITIN LYSINE 63-LINKED MULTIUBIQUITIN CHAINS.* J BIOL CHEM, 2005. 280(17): p. 16619-24.
88. LIM, K.L., ET AL., *PARKIN MEDIATES NONCLASSICAL, PROTEASOMAL-INDEPENDENT UBIQUITINATION OF SYNPHILIN-1: IMPLICATIONS FOR LEWY BODY FORMATION.* J NEUROSCI, 2005. 25(8): p. 2002-9.
89. DURCAN, T.M., ET AL., *ATAXIN-3 DEUBIQUITINATION IS COUPLED TO PARKIN UBIQUITINATION VIA E2 UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME.* J BIOL CHEM, 2012. 287(1): p. 531-41.
90. LAZAROU, M., ET AL., *PINK1 DRIVES PARKIN SELF-ASSOCIATION AND HECT-LIKE E3 ACTIVITY UPSTREAM OF MITOCHONDRIAL BINDING.* J CELL BIOL, 2013. 200(2): p. 163-72.
91. CORTI, O., S. LESAGE, AND A. BRICE, *WHAT GENETICS TELLS US ABOUT THE CAUSES AND MECHANISMS OF PARKINSON'S DISEASE.* PHYSIOL REV. 91(4): p. 1161-218.
92. DAWSON, T.M. AND V.L. DAWSON, *THE ROLE OF PARKIN IN FAMILIAL AND SPORADIC PARKINSON'S DISEASE.* MOV DISORD. 25 SUPPL 1: p. S32-9.

93. SUN, X., ET AL., *PARKIN DEFICIENCY CONTRIBUTES TO PANCREATIC TUMORIGENESIS BY INDUCING SPINDLE MULTIPOLARITY AND MISORIENTATION*. *CELL CYCLE*, 2013. 12(7): p. 1133-41.
94. IKEUCHI, K., ET AL., *ATTENUATION OF PROTEOLYSIS-MEDIATED CYCLIN E REGULATION BY ALTERNATIVELY SPLICED PARKIN IN HUMAN COLORECTAL CANCERS*. *INT J CANCER*, 2009. 125(9): p. 2029-35.
95. STAROPOLI, J.F., ET AL., *PARKIN IS A COMPONENT OF AN SCF-LIKE UBIQUITIN LIGASE COMPLEX AND PROTECTS POSTMITOTIC NEURONS FROM KAINATE EXCITOTOXICITY*. *NEURON*, 2003. 37(5): p. 735-49.
96. TAY, S.P., ET AL., *PARKIN ENHANCES THE EXPRESSION OF CYCLIN-DEPENDENT KINASE 6 AND NEGATIVELY REGULATES THE PROLIFERATION OF BREAST CANCER CELLS*. *J BIOL CHEM*, 2010. 285(38): p. 29231-8.
97. CHEN, Y., ET AL., *THE C-TERMINUS OF PARK2 IS REQUIRED FOR ITS SELF-INTERACTION, SOLUBILITY AND ROLE IN THE SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT*. *BIOCHIM BIOPHYS ACTA*, 2012. 1822(4): p. 573-80.
98. JIANG, Q., Y. REN, AND J. FENG, *DIRECT BINDING WITH HISTONE DEACETYLASE 6 MEDIATES THE REVERSIBLE RECRUITMENT OF PARKIN TO THE CENTROSOME*. *J NEUROSCI*, 2008. 28(48): p. 12993-3002.
99. LIU, M., ET AL., *PARKIN REGULATES Eg5 EXPRESSION BY Hsp70 UBIQUITINATION-DEPENDENT INACTIVATION OF C-JUN NH2-TERMINAL KINASE*. *J BIOL CHEM*, 2008. 283(51): p. 35783-8.
100. YANG, F., ET AL., *PARKIN STABILIZES MICROTUBULES THROUGH STRONG BINDING MEDIATED BY THREE INDEPENDENT DOMAINS*. *J BIOL CHEM*, 2005. 280(17): p. 17154-62.
101. REN, Y., ET AL., *PARKIN PROTECTS DOPAMINERGIC NEURONS AGAINST MICROTUBULE-DEPOLYMERIZING TOXINS BY ATTENUATING MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN KINASE ACTIVATION*. *J BIOL CHEM*, 2009. 284(6): p. 4009-17.
102. REN, Y., J. ZHAO, AND J. FENG, *PARKIN BINDS TO ALPHA/BETA TUBULIN AND INCREASES THEIR UBIQUITINATION AND DEGRADATION*. *J NEUROSCI*, 2003. 23(8): p. 3316-24.
103. DARIOS, F., ET AL., *PARKIN PREVENTS MITOCHONDRIAL SWELLING AND CYTOCHROME C RELEASE IN MITOCHONDRIA-DEPENDENT CELL DEATH*. *HUM MOL GENET*, 2003. 12(5): p. 517-26.
104. GEGG, M.E., ET AL., *MITOFUSIN 1 AND MITOFUSIN 2 ARE UBIQUITINATED IN A PINK1/PARKIN-DEPENDENT MANNER UPON INDUCTION OF MITOPHAGY*. *HUM MOL GENET*, 2010. 19(24): p. 4861-70.
105. ZIVIANI, E., R.N. TAO, AND A.J. WHITWORTH, *DROSOPHILA PARKIN REQUIRES PINK1 FOR MITOCHONDRIAL TRANSLOCATION AND UBIQUITINATES MITOFUSIN*. *PROC NATL ACAD SCI U S A*, 2010. 107(11): p. 5018-23.
106. LUTZ, A.K., ET AL., *LOSS OF PARKIN OR PINK1 FUNCTION INCREASES DRP1-DEPENDENT MITOCHONDRIAL FRAGMENTATION*. *J BIOL CHEM*, 2009. 284(34): p. 22938-51.
107. WANG, H., ET AL., *PARKIN UBIQUITINATES DRP1 FOR PROTEASOME-DEPENDENT DEGRADATION: IMPLICATION OF DYSREGULATED MITOCHONDRIAL DYNAMICS IN PARKINSON DISEASE*. *J BIOL CHEM*, 2011. 286(13): p. 11649-58.
108. CUI, M., ET AL., *PERTURBATIONS IN MITOCHONDRIAL DYNAMICS INDUCED BY HUMAN MUTANT PINK1 CAN BE RESCUED BY THE MITOCHONDRIAL DIVISION INHIBITOR MDIVI-1*. *J BIOL CHEM*, 2010. 285(15): p. 11740-52.
109. ABBAS, N., ET AL., *A WIDE VARIETY OF MUTATIONS IN THE PARKIN GENE ARE RESPONSIBLE FOR AUTOSOMAL RECESSIVE PARKINSONISM IN EUROPE. FRENCH PARKINSON'S DISEASE GENETICS STUDY GROUP AND THE EUROPEAN CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY IN PARKINSON'S DISEASE*. *HUM MOL GENET*, 1999. 8(4): p. 567-74.
110. HATTORI, N., ET AL., *MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF A NOVEL PARKIN GENE IN JAPANESE FAMILIES WITH AUTOSOMAL RECESSIVE JUVENILE PARKINSONISM: EVIDENCE FOR VARIABLE HOMOZYGOUS DELETIONS IN THE PARKIN GENE IN AFFECTED INDIVIDUALS*. *ANN NEUROL*, 1998. 44(6): p. 935-41.
111. HATTORI, N., ET AL., *POINT MUTATIONS (THR240ARG AND GLN311STOP) [CORRECTION OF THR240ARG AND ALA311STOP] IN THE PARKIN GENE*. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*, 1998. 249(3): p. 754-8.
112. KANN, M., ET AL., *ROLE OF PARKIN MUTATIONS IN 111 COMMUNITY-BASED PATIENTS WITH EARLY-ONSET PARKINSONISM*. *ANN NEUROL*, 2002. 51(5): p. 621-5.
113. KLEIN, C., ET AL., *FREQUENCY OF PARKIN MUTATIONS IN LATE-ONSET PARKINSON'S DISEASE*. *ANN NEUROL*, 2003. 54(3): p. 415-6; AUTHOR REPLY 416-7.
114. KLEIN, C., ET AL., *PARKIN DELETIONS IN A FAMILY WITH ADULT-ONSET, TREMOR-DOMINANT PARKINSONISM: EXPANDING THE PHENOTYPE*. *ANN NEUROL*, 2000. 48(1): p. 65-71.
115. KLEIN, C., ET AL., *ASSOCIATION STUDIES OF PARKINSON'S DISEASE AND PARKIN POLYMORPHISMS*. *ANN NEUROL*, 2000. 48(1): p. 126-7.
116. BERGER, A.K., ET AL., *PARKIN SELECTIVELY ALTERS THE INTRINSIC THRESHOLD FOR MITOCHONDRIAL CYTOCHROME C RELEASE*. *HUM MOL GENET*, 2009. 18(22): p. 4317-28.
117. IMAI, Y., ET AL., *AN UNFOLDED PUTATIVE TRANSMEMBRANE POLYPEPTIDE, WHICH CAN LEAD TO ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS, IS A SUBSTRATE OF PARKIN*. *CELL*, 2001. 105(7): p. 891-902.
118. YEO, C.W., ET AL., *PARKIN PATHWAY ACTIVATION MITIGATES GLIOMA CELL PROLIFERATION AND PREDICTS PATIENT SURVIVAL*. *CANCER RES*, 2012. 72(10): p. 2543-53.
119. DA COSTA, C.A., ET AL., *TRANSCRIPTIONAL REPRESSION OF P53 BY PARKIN AND IMPAIRMENT BY MUTATIONS ASSOCIATED WITH AUTOSOMAL RECESSIVE JUVENILE PARKINSON'S DISEASE*. *NAT CELL BIOL*, 2009. 11(11): p. 1370-5.
120. SUNICO, C.R., ET AL., *S-NITROSYLATION OF PARKIN AS A NOVEL REGULATOR OF P53-MEDIATED NEURONAL CELL DEATH IN SPORADIC PARKINSON'S DISEASE*. *MOL NEURODEGENER*, 2013. 8: p. 29.
121. KERR, J.F., A.H. WYLLIE, AND A.R. CURRIE, *APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS*. *BR J CANCER*, 1972. 26(4): p. 239-57.
122. ALVES DA COSTA, C. AND F. CHECLER, *APOPTOSIS IN PARKINSON'S DISEASE: IS P53 THE MISSING LINK BETWEEN GENETIC AND SPORADIC PARKINSONISM?* *CELL SIGNAL*, 2011. 23(6): p. 963-8.
123. CHAO, D.T. AND S.J. KORSMEYER, *BCL-2 FAMILY: REGULATORS OF CELL DEATH*. *ANNU REV IMMUNOL*, 1998. 16: p. 395-419.

124. ZAMZAMI, N., ET AL., *SUBCELLULAR AND SUBMITOCHONDRIAL MODE OF ACTION OF BCL-2-LIKE ONCOPROTEINS*. ONCOGENE, 1998. 16(17): P. 2265-82.
125. NICHOLSON, D.W. AND N.A. THORNBERRY, *CASPASES: KILLER PROTEASES*. TRENDS BIOCHEM SCI, 1997. 22(8): P. 299-306.
126. LEVINE, B. AND G. KROEMER, *AUTOPHAGY IN AGING, DISEASE AND DEATH: THE TRUE IDENTITY OF A CELL DEATH IMPOSTOR*. CELL DEATH DIFFER, 2009. 16(1): P. 1-2.
127. MORDIER, S., ET AL., *LEUCINE LIMITATION INDUCES AUTOPHAGY AND ACTIVATION OF LYSOSOME-DEPENDENT PROTEOLYSIS IN C2C12 MYOTUBES THROUGH A MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN-INDEPENDENT SIGNALING PATHWAY*. J BIOL CHEM, 2000. 275(38): P. 29900-6.
128. KIFFIN, R., ET AL., *ACTIVATION OF CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY DURING OXIDATIVE STRESS*. MOL BIOL CELL, 2004. 15(11): P. 4829-40.
129. DATAN, E., ET AL., *MTOR/p70S6K SIGNALING DISTINGUISHES ROUTINE, MAINTENANCE-LEVEL AUTOPHAGY FROM AUTOPHAGIC CELL DEATH DURING INFLUENZA A INFECTION*. VIROLOGY, 2014. 452-453: P. 175-90.
130. GHAVAMI, S., ET AL., *AUTOPHAGY AND APOPTOSIS DYSFUNCTION IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS*. PROG NEUROBIOL, 2014. 112: P. 24-49.
131. SUZUKI, K., *SELECTIVE AUTOPHAGY IN BUDDING YEAST*. CELL DEATH DIFFER, 2013. 20(1): P. 43-8.
132. CUERVO, A.M., *CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY: DICE'S 'WILD' IDEA ABOUT LYSOSOMAL SELECTIVITY*. NAT REV MOL CELL BIOL, 2011. 12(8): P. 535-41.
133. DELEO, A.B., ET AL., *DETECTION OF A TRANSFORMATION-RELATED ANTIGEN IN CHEMICALLY INDUCED SARCOMAS AND OTHER TRANSFORMED CELLS OF THE MOUSE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1979. 76(5): P. 2420-4.
134. LANE, D.P. AND L.V. CRAWFORD, *T ANTIGEN IS BOUND TO A HOST PROTEIN IN SV40-TRANSFORMED CELLS*. NATURE, 1979. 278(5701): P. 261-3.
135. LINZER, D.I. AND A.J. LEVINE, *CHARACTERIZATION OF A 54K DALTON CELLULAR SV40 TUMOR ANTIGEN PRESENT IN SV40-TRANSFORMED CELLS AND UNINFECTED EMBRYONAL CARCINOMA CELLS*. CELL, 1979. 17(1): P. 43-52.
136. MELERO, J.A., ET AL., *IDENTIFICATION OF NEW POLYPEPTIDE SPECIES (48-55K) IMMUNOPRECIPITABLE BY ANTISERUM TO PURIFIED LARGE T ANTIGEN AND PRESENT IN SV40-INFECTED AND -TRANSFORMED CELLS*. VIROLOGY, 1979. 93(2): P. 466-80.
137. EL-DEIRY, W.S., ET AL., *DEFINITION OF A CONSENSUS BINDING SITE FOR P53*. NAT GENET, 1992. 1(1): P. 45-9.
138. FUNK, W.D., ET AL., *A TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE DNA-BINDING SITE FOR HUMAN P53 PROTEIN COMPLEXES*. MOL CELL BIOL, 1992. 12(6): P. 2866-71.
139. HAUPT, Y., ET AL., *MDM2 PROMOTES THE RAPID DEGRADATION OF P53*. NATURE, 1997. 387(6630): P. 296-9.
140. SIGAL, A. AND V. ROTTER, *ONCOGENIC MUTATIONS OF THE P53 TUMOR SUPPRESSOR: THE DEMONS OF THE GUARDIAN OF THE GENOME*. CANCER RES, 2000. 60(24): P. 6788-93.
141. LANE, D.P., *CANCER. P53, GUARDIAN OF THE GENOME*. NATURE, 1992. 358(6381): P. 15-6.
142. SCHERZ-SHOVAL, R., ET AL., *P53-DEPENDENT REGULATION OF AUTOPHAGY PROTEIN LC3 SUPPORTS CANCER CELL SURVIVAL UNDER PROLONGED STARVATION*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2010. 107(43): P. 18511-6.
143. MAIURI, M.C., ET AL., *AUTOPHAGY REGULATION BY P53*. CURR OPIN CELL BIOL, 2010. 22(2): P. 181-5.
144. MORSELLI, E., ET AL., *MUTANT P53 PROTEIN LOCALIZED IN THE CYTOPLASM INHIBITS AUTOPHAGY*. CELL CYCLE, 2008. 7(19): P. 3056-61.
145. LEV, N., E. MELAMED, AND D. OFFEN, *APOPTOSIS AND PARKINSON'S DISEASE*. PROG NEUROPSYCHOPHARMACOL BIOL PSYCHIATRY, 2003. 27(2): P. 245-50.
146. KOSEL, S., ET AL., *ON THE QUESTION OF APOPTOSIS IN THE PARKINSONIAN SUBSTANTIA NIGRA*. ACTA NEUROPATHOL, 1997. 93(2): P. 105-8.
147. TATTON, N.A. AND S.J. KISH, *IN SITU DETECTION OF APOPTOTIC NUCLEI IN THE SUBSTANTIA NIGRA COMPACTA OF 1-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE-TREATED MICE USING TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE LABELLING AND ACRIDINE ORANGE STAINING*. NEUROSCIENCE, 1997. 77(4): P. 1037-48.
148. TATTON, N.A., ET AL., *A FLUORESCENT DOUBLE-LABELING METHOD TO DETECT AND CONFIRM APOPTOTIC NUCLEI IN PARKINSON'S DISEASE*. ANN NEUROL, 1998. 44(3 SUPPL 1): P. S142-8.
149. ANGLADE, P., ET AL., *APOPTOSIS IN DOPAMINERGIC NEURONS OF THE HUMAN SUBSTANTIA NIGRA DURING NORMAL AGING*. HISTOL HISTOPATHOL, 1997. 12(3): P. 603-10.
150. MOCHIZUKI, H., ET AL., *HISTOCHEMICAL DETECTION OF APOPTOSIS IN PARKINSON'S DISEASE*. J NEUROL SCI, 1996. 137(2): P. 120-3.
151. DE LA MONTE, S.M., ET AL., *P53- AND CD95-ASSOCIATED APOPTOSIS IN NEURODEGENERATIVE DISEASES*. LAB INVEST, 1998. 78(4): P. 401-11.
152. HARTMANN, A., ET AL., *CASPASE-3: A VULNERABILITY FACTOR AND FINAL EFFECTOR IN APOPTOTIC DEATH OF DOPAMINERGIC NEURONS IN PARKINSON'S DISEASE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2000. 97(6): P. 2875-80.
153. ANDERSEN, J.K., *DOES NEURONAL LOSS IN PARKINSON'S DISEASE INVOLVE PROGRAMMED CELL DEATH?* BIOESSAYS, 2001. 23(7): P. 640-6.
154. SIMUNOVIC, F., ET AL., *GENE EXPRESSION PROFILING OF SUBSTANTIA NIGRA DOPAMINE NEURONS: FURTHER INSIGHTS INTO PARKINSON'S DISEASE PATHOLOGY*. BRAIN, 2009. 132(Pt 7): P. 1795-809.
155. HARTMANN, A., ET AL., *CASPASE-8 IS AN EFFECTOR IN APOPTOTIC DEATH OF DOPAMINERGIC NEURONS IN PARKINSON'S DISEASE, BUT PATHWAY INHIBITION RESULTS IN NEURONAL NECROSIS*. J NEUROSCI, 2001. 21(7): P. 2247-55.
156. HOOZEMANS, J.J., ET AL., *ACTIVATION OF THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE IN PARKINSON'S DISEASE*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 2007. 354(3): P. 707-11.
157. MASSERANO, J.M., ET AL., *DOPAMINE INDUCES APOPTOTIC CELL DEATH OF A CATECHOLAMINERGIC CELL LINE DERIVED FROM THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM*. MOL PHARMACOL, 1996. 50(5): P. 1309-15.

158. ZILKHA-FALB, R., ET AL., *MONOAMINE-INDUCED APOPTOTIC NEURONAL CELL DEATH*. CELL MOL NEUROBIOL, 1997. 17(1): p. 101-18.
159. ZIV, I., ET AL., *DOPAMINE INDUCES APOPTOSIS-LIKE CELL DEATH IN CULTURED CHICK SYMPATHETIC NEURONS--A POSSIBLE NOVEL PATHOGENETIC MECHANISM IN PARKINSON'S DISEASE*. NEUROSCI LETT, 1994. 170(1): p. 136-40.
160. OFFEN, D., ET AL., *DOPAMINE-INDUCED PROGRAMMED CELL DEATH IN MOUSE THYMOCYTES*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 1995. 1268(2): p. 171-7.
161. TAKAI, N., ET AL., *INVOLVEMENT OF CASPASE-LIKE PROTEINASES IN APOPTOSIS OF NEURONAL PC12 CELLS AND PRIMARY CULTURED MICROGLIA INDUCED BY 6-HYDROXYDOPAMINE*. J NEUROSCI RES, 1998. 54(2): p. 214-22.
162. PRZEDBORSKI, S. AND V. JACKSON-LEWIS, *MECHANISMS OF MPTP TOXICITY*. MOV DISORD, 1998. 13 SUPPL 1: p. 35-8.
163. HE, Y., T. LEE, AND S.K. LEONG, *6-HYDROXYDOPAMINE INDUCED APOPTOSIS OF DOPAMINERGIC CELLS IN THE RAT SUBSTANTIA NIGRA*. BRAIN RES, 2000. 858(1): p. 163-6.
164. BARZILAI, A., ET AL., *THE MOLECULAR MECHANISM OF DOPAMINE-INDUCED APOPTOSIS: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GENES THAT MEDIATE DOPAMINE TOXICITY*. J NEURAL TRANSM SUPPL, 2000(60): p. 59-76.
165. JUNN, E. AND M.M. MOURADIAN, *APOPTOTIC SIGNALING IN DOPAMINE-INDUCED CELL DEATH: THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS, P38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE, CYTOCHROME C AND CASPASES*. J NEUROCHEM, 2001. 78(2): p. 374-83.
166. LUO, Y., ET AL., *DOPAMINE INDUCES APOPTOSIS THROUGH AN OXIDATION-INVOLVED SAPK/JNK ACTIVATION PATHWAY*. J BIOL CHEM, 1998. 273(6): p. 3756-64.
167. FENTEANY, G. AND S.L. SCHREIBER, *LACTACYSTIN, PROTEASOME FUNCTION, AND CELL FATE*. J BIOL CHEM, 1998. 273(15): p. 8545-8.
168. ZHOU, H.Y., ET AL., *PROTEASOME INHIBITOR LACTACYSTIN INDUCES CHOLINERGIC DEGENERATION*. CAN J NEUROL SCI, 2010. 37(2): p. 229-34.
169. MOGI, M., ET AL., *P53 PROTEIN, INTERFERON-GAMMA, AND NF-KAPPA B LEVELS ARE ELEVATED IN THE PARKINSONIAN BRAIN*. NEUROSCI LETT, 2007. 414(1): p. 94-7.
170. VOGELSTEIN, B., D. LANE, AND A.J. LEVINE, *SURFING THE P53 NETWORK*. NATURE, 2000. 408(6810): p. 307-10.
171. NAIR, V.D., ET AL., *P53 MEDIATES NONTRANSCRIPTIONAL CELL DEATH IN DOPAMINERGIC CELLS IN RESPONSE TO PROTEASOME INHIBITION*. J BIOL CHEM, 2006. 281(51): p. 39550-60.
172. LEE, S.J., ET AL., *REGULATION OF P53 BY ACTIVATED PROTEIN KINASE C-DELTA DURING NITRIC OXIDE-INDUCED DOPAMINERGIC CELL DEATH*. J BIOL CHEM, 2006. 281(4): p. 2215-24.
173. NAIR, V.D., *ACTIVATION OF P53 SIGNALING INITIATES APOPTOTIC DEATH IN A CELLULAR MODEL OF PARKINSON'S DISEASE*. APOPTOSIS, 2006. 11(6): p. 955-66.
174. BISWAS, S.C., ET AL., *PUMA AND P53 PLAY REQUIRED ROLES IN DEATH EVOKED IN A CELLULAR MODEL OF PARKINSON DISEASE*. NEUROCHEM RES, 2005. 30(6-7): p. 839-45.
175. KOMAROV, P.G., ET AL., *A CHEMICAL INHIBITOR OF P53 THAT PROTECTS MICE FROM THE SIDE EFFECTS OF CANCER THERAPY*. SCIENCE, 1999. 285(5434): p. 1733-7.
176. XU, Z., ET AL., *SELECTIVE ALTERATIONS OF TRANSCRIPTION FACTORS IN MPP+-INDUCED NEUROTOXICITY IN PC12 CELLS*. NEUROTOXICOLOGY, 2005. 26(4): p. 729-37.
177. TRIMMER, P.A., ET AL., *DOPAMINE NEURONS FROM TRANSGENIC MICE WITH A KNOCKOUT OF THE P53 GENE RESIST MPTP NEUROTOXICITY*. NEURODEGENERATION, 1996. 5(3): p. 233-9.
178. OTTOLINI, D., ET AL., *THE PARKINSON DISEASE-RELATED PROTEIN DJ-1 COUNTERACTS MITOCHONDRIAL IMPAIRMENT INDUCED BY THE TUMOUR SUPPRESSOR PROTEIN P53 BY ENHANCING ENDOPLASMIC RETICULUM-MITOCHONDRIA TETHERING*. HUM MOL GENET, 2013. 22(11): p. 2152-68.
179. DA COSTA, C.A., *DJ-1: A NEWCOMER IN PARKINSON'S DISEASE PATHOLOGY*. CURR MOL MED, 2007. 7(7): p. 650-7.
180. GIAIME, E., ET AL., *LOSS OF FUNCTION OF DJ-1 TRIGGERED BY PARKINSON'S DISEASE-ASSOCIATED MUTATION IS DUE TO PROTEOLYTIC RESISTANCE TO CASPASE-6*. CELL DEATH DIFFER, 2010. 17(1): p. 158-69.
181. FAN, J., ET AL., *SUMOYLATION IS CRITICAL FOR DJ-1 TO REPRESS P53 TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY*. FEBS LETT, 2008. 582(7): p. 1151-6.
182. SHINBO, Y., ET AL., *DJ-1 RESTORES P53 TRANSCRIPTION ACTIVITY INHIBITED BY TOPORS/P53BP3*. INT J ONCOL, 2005. 26(3): p. 641-8.
183. RAHMAN-ROBLICK, R., ET AL., *PROTEOMIC IDENTIFICATION OF P53-DEPENDENT PROTEIN PHOSPHORYLATION*. ONCOGENE, 2008. 27(35): p. 4854-9.
184. ALVES DA COSTA, C., ET AL., *ALPHA-SYNUCLEIN LOWERS P53-DEPENDENT APOPTOTIC RESPONSE OF NEURONAL CELLS. ABOLISHMENT BY 6-HYDROXYDOPAMINE AND IMPLICATION FOR PARKINSON'S DISEASE*. J BIOL CHEM, 2002. 277(52): p. 50980-4.
185. CLEVELAND, D.W., S.Y. HWO, AND M.W. KIRSCHNER, *PURIFICATION OF TAU, A MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN THAT INDUCES ASSEMBLY OF MICROTUBULES FROM PURIFIED TUBULIN*. J MOL BIOL, 1977. 116(2): p. 207-25.
186. CLEVELAND, D.W., S.Y. HWO, AND M.W. KIRSCHNER, *PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF PURIFIED TAU FACTOR AND THE ROLE OF TAU IN MICROTUBULE ASSEMBLY*. J MOL BIOL, 1977. 116(2): p. 227-47.
187. WITMAN, G.B., ET AL., *TUBULIN REQUIRES TAU FOR GROWTH ONTO MICROTUBULE INITIATING SITES*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1976. 73(11): p. 4070-4.
188. WEINGARTEN, M.D., ET AL., *A PROTEIN FACTOR ESSENTIAL FOR MICROTUBULE ASSEMBLY*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1975. 72(5): p. 1858-62.
189. DIXIT, R., ET AL., *DIFFERENTIAL REGULATION OF DYNEIN AND KINESIN MOTOR PROTEINS BY TAU*. SCIENCE, 2008. 319(5866): p. 1086-9.

190. TRINCZEK, B., ET AL., *TAU REGULATES THE ATTACHMENT/DETACHMENT BUT NOT THE SPEED OF MOTORS IN MICROTUBULE-DEPENDENT TRANSPORT OF SINGLE VESICLES AND ORGANELLES*. J CELL SCI, 1999. 112 (Pt 14): P. 2355-67.
191. BALLATORE, C., V.M. LEE, AND J.Q. TROJANOWSKI, *TAU-MEDIATED NEURODEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED DISORDERS*. NAT REV NEUROSCI, 2007. 8(9): P. 663-72.
192. ALONSO, A.C., I. GRUNDKE-IQBAL, AND K. IQBAL, *ALZHEIMER'S DISEASE HYPERPHOSPHORYLATED TAU SEQUESTERS NORMAL TAU INTO TANGLES OF FILAMENTS AND DISASSEMBLES MICROTUBULES*. NAT MED, 1996. 2(7): P. 783-7.
193. REITZ, C., C. BRAYNE, AND R. MAYEUX, *EPIDEMIOLOGY OF ALZHEIMER DISEASE*. NAT REV NEUROL, 2011. 7(3): P. 137-52.
194. YAMAGISHI, S., ET AL., *SERUM OR CEREBROSPINAL FLUID LEVELS OF GLYCERALDEHYDE-DERIVED ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (AGEs) MAY BE A PROMISING BIOMARKER FOR EARLY DETECTION OF ALZHEIMER'S DISEASE*. MED HYPOTHESES, 2005. 64(6): P. 1205-7.
195. YAN, S.D., ET AL., *RAGE AND AMYLOID-BETA PEPTIDE NEUROTOXICITY IN ALZHEIMER'S DISEASE*. NATURE, 1996. 382(6593): P. 685-91.
196. CRAFT, S., *INSULIN RESISTANCE AND ALZHEIMER'S DISEASE PATHOGENESIS: POTENTIAL MECHANISMS AND IMPLICATIONS FOR TREATMENT*. CURR ALZHEIMER RES, 2007. 4(2): P. 147-52.
197. PROFENNO, L.A., A.P. PORSTEINSSON, AND S.V. FARAONE, *META-ANALYSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE RISK WITH OBESITY, DIABETES, AND RELATED DISORDERS*. BIOL PSYCHIATRY, 2010. 67(6): P. 505-12.
198. BERTRAM, L., ET AL., *SYSTEMATIC META-ANALYSES OF ALZHEIMER DISEASE GENETIC ASSOCIATION STUDIES: THE ALZGENE DATABASE*. NAT GENET, 2007. 39(1): P. 17-23.
199. HARDY, J. AND D.J. SELKOE, *THE AMYLOID HYPOTHESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE: PROGRESS AND PROBLEMS ON THE ROAD TO THERAPEUTICS*. SCIENCE, 2002. 297(5580): P. 353-6.
200. HARDY, J.A. AND G.A. HIGGINS, *ALZHEIMER'S DISEASE: THE AMYLOID CASCADE HYPOTHESIS*. SCIENCE, 1992. 256(5054): P. 184-5.
201. TANZI, R.E., ET AL., *GENETIC LINKAGE MAP OF HUMAN CHROMOSOME 21*. GENOMICS, 1988. 3(2): P. 129-36.
202. TANZI, R.E., ET AL., *PROTEASE INHIBITOR DOMAIN ENCODED BY AN AMYLOID PROTEIN PRECURSOR mRNA ASSOCIATED WITH ALZHEIMER'S DISEASE*. NATURE, 1988. 331(6156): P. 528-30.
203. KITAGUCHI, N., ET AL., *NOVEL PRECURSOR OF ALZHEIMER'S DISEASE AMYLOID PROTEIN SHOWS PROTEASE INHIBITORY ACTIVITY*. NATURE, 1988. 331(6156): P. 530-2.
204. PONTE, P., ET AL., *A NEW A4 AMYLOID mRNA CONTAINS A DOMAIN HOMOLOGOUS TO SERINE PROTEINASE INHIBITORS*. NATURE, 1988. 331(6156): P. 525-7.
205. WEIDEMANN, A., ET AL., *IDENTIFICATION, BIOGENESIS, AND LOCALIZATION OF PRECURSORS OF ALZHEIMER'S DISEASE A4 AMYLOID PROTEIN*. CELL, 1989. 57(1): P. 115-26.
206. HUNG, A.Y., ET AL., *INCREASED EXPRESSION OF BETA-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN DURING NEURONAL DIFFERENTIATION IS NOT ACCOMPANIED BY SECRETORY CLEAVAGE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1992. 89(20): P. 9439-43.
207. HO, A. AND T.C. SUDHOF, *BINDING OF F-SPONDIN TO AMYLOID-BETA PRECURSOR PROTEIN: A CANDIDATE AMYLOID-BETA PRECURSOR PROTEIN LIGAND THAT MODULATES AMYLOID-BETA PRECURSOR PROTEIN CLEAVAGE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2004. 101(8): P. 2548-53.
208. ROBERTS, S.B., ET AL., *NON-AMYLOIDOGENIC CLEAVAGE OF THE BETA-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BY AN INTEGRAL MEMBRANE METALLOENDOPEPTIDASE*. J BIOL CHEM, 1994. 269(4): P. 3111-6.
209. HUSSAIN, I., ET AL., *IDENTIFICATION OF A NOVEL ASPARTIC PROTEASE (ASP 2) AS BETA-SECRETASE*. MOL CELL NEUROSCI, 1999. 14(6): P. 419-27.
210. LIN, X., ET AL., *HUMAN ASPARTIC PROTEASE MEMAP SIN 2 CLEAVES THE BETA-SECRETASE SITE OF BETA-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2000. 97(4): P. 1456-60.
211. SINHA, S., ET AL., *PURIFICATION AND CLONING OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BETA-SECRETASE FROM HUMAN BRAIN*. NATURE, 1999. 402(6761): P. 537-40.
212. VASSAR, R., ET AL., *BETA-SECRETASE CLEAVAGE OF ALZHEIMER'S AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BY THE TRANSMEMBRANE ASPARTIC PROTEASE BACE*. SCIENCE, 1999. 286(5440): P. 735-41.
213. YAN, R., ET AL., *MEMBRANE-ANCHORED ASPARTYL PROTEASE WITH ALZHEIMER'S DISEASE BETA-SECRETASE ACTIVITY*. NATURE, 1999. 402(6761): P. 533-7.
214. VASSAR, R. AND M. CITRON, *ABETA-GENERATING ENZYMES: RECENT ADVANCES IN BETA- AND GAMMA-SECRETASE RESEARCH*. NEURON, 2000. 27(3): P. 419-22.
215. BENJANNET, S., ET AL., *POST-TRANSLATIONAL PROCESSING OF BETA-SECRETASE (BETA-AMYLOID-CONVERTING ENZYME) AND ITS ECTODOMAIN SHEDDING. THE PRO- AND TRANSMEMBRANE/CYTOSOLIC DOMAINS AFFECT ITS CELLULAR ACTIVITY AND AMYLOID-BETA PRODUCTION*. J BIOL CHEM, 2001. 276(14): P. 10879-87.
216. VASSAR, R., ET AL., *FUNCTION, THERAPEUTIC POTENTIAL AND CELL BIOLOGY OF BACE PROTEASES: CURRENT STATUS AND FUTURE PROSPECTS*. J NEUROCHEM, 2014. 130(1): P. 4-28.
217. SANTOSA, C., ET AL., *DECREASED EXPRESSION OF GGA3 PROTEIN IN ALZHEIMER'S DISEASE FRONTAL CORTEX AND INCREASED CO-DISTRIBUTION OF BACE WITH THE AMYLOID PRECURSOR PROTEIN*. NEUROBIOL DIS, 2011. 43(1): P. 176-83.
218. STOCKLEY, J.H. AND C. O'NEILL, *THE PROTEINS BACE1 AND BACE2 AND BETA-SECRETASE ACTIVITY IN NORMAL AND ALZHEIMER'S DISEASE BRAIN*. BIOCHEM SOC TRANS, 2007. 35(Pt 3): P. 574-6.
219. EDBAUER, D., ET AL., *RECONSTITUTION OF GAMMA-SECRETASE ACTIVITY*. NAT CELL BIOL, 2003. 5(5): P. 486-8.
220. WOLFE, M.S., *THE GAMMA-SECRETASE COMPLEX: MEMBRANE-EMBEDDED PROTEOLYTIC ENSEMBLE*. BIOCHEMISTRY, 2006. 45(26): P. 7931-9.

221. WOLFE, M.S., *TOWARD THE STRUCTURE OF PRESENILIN/GAMMA-SECRETASE AND PRESENILIN HOMOLOGS*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 2013. 1828(12): p. 2886-97.
222. DRIES, D.R. AND G. YU, *ASSEMBLY, MATURATION, AND TRAFFICKING OF THE GAMMA-SECRETASE COMPLEX IN ALZHEIMER'S DISEASE*. CURR ALZHEIMER RES, 2008. 5(2): p. 132-46.
223. PASTERNAK, S.H., ET AL., *PRESENILIN-1, NICAISTRIN, AMYLOID PRECURSOR PROTEIN, AND GAMMA-SECRETASE ACTIVITY ARE CO-LOCALIZED IN THE LYSOSOMAL MEMBRANE*. J BIOL CHEM, 2003. 278(29): p. 26687-94.
224. MECKLER, X. AND F. CHECLER, *VISUALIZATION OF SPECIFIC GAMMA-SECRETASE COMPLEXES USING BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION*. J ALZHEIMERS DIS, 2014. 40(1): p. 161-76.
225. ST GEORGE-HYSLOP, P. AND P.E. FRASER, *ASSEMBLY OF THE PRESENILIN GAMMA-/EPSILON-SECRETASE COMPLEX*. J NEUROCHEM, 2012. 120 SUPPL 1: p. 84-8.
226. CHEN, F., ET AL., *TMP21 IS A PRESENILIN COMPLEX COMPONENT THAT MODULATES GAMMA-SECRETASE BUT NOT EPSILON-SECRETASE ACTIVITY*. NATURE, 2006. 440(7088): p. 1208-12.
227. VERDILE, G., S.E. GANDY, AND R.N. MARTINS, *THE ROLE OF PRESENILIN AND ITS INTERACTING PROTEINS IN THE BIOGENESIS OF ALZHEIMER'S BETA AMYLOID*. NEUROCHEM RES, 2007. 32(4-5): p. 609-23.
228. HAAPASALO, A. AND D.M. KOVACS, *THE MANY SUBSTRATES OF PRESENILIN/GAMMA-SECRETASE*. J ALZHEIMERS DIS, 2011. 25(1): p. 3-28.
229. DE STROOPER, B., ET AL., *DEFICIENCY OF PRESENILIN-1 INHIBITS THE NORMAL CLEAVAGE OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN*. NATURE, 1998. 391(6665): p. 387-90.
230. WOLFE, M.S., ET AL., *TWO TRANSMEMBRANE ASPARTATES IN PRESENILIN-1 REQUIRED FOR PRESENILIN ENDOPROTEOLYSIS AND GAMMA-SECRETASE ACTIVITY*. NATURE, 1999. 398(6727): p. 513-7.
231. LAUDON, H., ET AL., *A NINE-TRANSMEMBRANE DOMAIN TOPOLOGY FOR PRESENILIN 1*. J BIOL CHEM, 2005. 280(42): p. 35352-60.
232. CAPELL, A., ET AL., *THE PROTEOLYTIC FRAGMENTS OF THE ALZHEIMER'S DISEASE-ASSOCIATED PRESENILIN-1 FORM HETERODIMERS AND OCCUR AS A 100-150-kDA MOLECULAR MASS COMPLEX*. J BIOL CHEM, 1998. 273(6): p. 3205-11.
233. JANICKI, S.M. AND M.J. MONTEIRO, *PRESENILIN OVEREXPRESSION ARRESTS CELLS IN THE G1 PHASE OF THE CELL CYCLE. ARREST POTENTIATED BY THE ALZHEIMER'S DISEASE PS2(N141I)MUTANT*. AM J PATHOL, 1999. 155(1): p. 135-44.
234. TU, H., ET AL., *PRESENILINS FORM ER Ca²⁺ LEAK CHANNELS, A FUNCTION DISRUPTED BY FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE-LINKED MUTATIONS*. CELL, 2006. 126(5): p. 981-93.
235. ZHANG, C., ET AL., *PRESENILINS ARE ESSENTIAL FOR REGULATING NEUROTRANSMITTER RELEASE*. NATURE, 2009. 460(7255): p. 632-6.
236. UEMURA, K., ET AL., *PRESENILIN 1 MEDIATES RETINOIC ACID-INDUCED DIFFERENTIATION OF SH-SY5Y CELLS THROUGH FACILITATION OF WNT SIGNALING*. J NEUROSCI RES, 2003. 73(2): p. 166-75.
237. GEORGAKOPOULOS, A., ET AL., *PRESENILIN-1 FORMS COMPLEXES WITH THE CADHERIN/CATENIN CELL-CELL ADHESION SYSTEM AND IS RECRUITED TO INTERCELLULAR AND SYNAPTIC CONTACTS*. MOL CELL, 1999. 4(6): p. 893-902.
238. RUBIO, M.E., ET AL., *ASSEMBLY OF THE N-CADHERIN COMPLEX DURING SYNAPSE FORMATION INVOLVES UNCOUPLING OF P120-CATENIN AND ASSOCIATION WITH PRESENILIN 1*. MOL CELL NEUROSCI, 2005. 30(4): p. 611-23.
239. UEMURA, K., ET AL., *PRESENILIN 1 IS INVOLVED IN MATURATION AND TRAFFICKING OF N-CADHERIN TO THE PLASMA MEMBRANE*. J NEUROSCI RES, 2003. 74(2): p. 184-91.
240. WANG, H.Q., ET AL., *INTERACTION OF PRESENILINS WITH FKBP38 PROMOTES APOPTOSIS BY REDUCING MITOCHONDRIAL Bcl-2*. HUM MOL GENET, 2005. 14(13): p. 1889-902.
241. TAKAMI, M., ET AL., *GAMMA-SECRETASE: SUCCESSIVE TRIPEPTIDE AND TETRAPEPTIDE RELEASE FROM THE TRANSMEMBRANE DOMAIN OF BETA-CARBOXYL TERMINAL FRAGMENT*. J NEUROSCI, 2009. 29(41): p. 13042-52.
242. PLANT, L.D., ET AL., *THE PRODUCTION OF AMYLOID BETA PEPTIDE IS A CRITICAL REQUIREMENT FOR THE VIABILITY OF CENTRAL NEURONS*. J NEUROSCI, 2003. 23(13): p. 5531-5.
243. BABA, A., ET AL., *BETA-AMYLOID PREVENTS EXCITOTOXICITY VIA RECRUITMENT OF GLIAL GLUTAMATE TRANSPORTERS*. NAUNYN SCHMIEDEBERGS ARCH PHARMACOL, 2003. 368(3): p. 234-8.
244. KAMENETZ, F., ET AL., *APP PROCESSING AND SYNAPTIC FUNCTION*. NEURON, 2003. 37(6): p. 925-37.
245. WIRTHS, O., ET AL., *INTRANEURONAL APP/A BETA TRAFFICKING AND PLAQUE FORMATION IN BETA-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND PRESENILIN-1 TRANSGENIC MICE*. BRAIN PATHOL, 2002. 12(3): p. 275-86.
246. LAURITZEN, I., ET AL., *THE BETA-SECRETASE-DERIVED C-TERMINAL FRAGMENT OF BETAAPP, C99, BUT NOT ABETA, IS A KEY CONTRIBUTOR TO EARLY INTRANEURONAL LESIONS IN TRIPLE-TRANSGENIC MOUSE HIPPOCAMPUS*. J NEUROSCI, 2012. 32(46): p. 16243-55A.
247. OHYAGI, Y., ET AL., *INTRACELLULAR ABETA42 ACTIVATES P53 PROMOTER: A PATHWAY TO NEURODEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE*. FASEB J, 2005. 19(2): p. 255-7.
248. PARADIS, E., ET AL., *AMYLOID BETA PEPTIDE OF ALZHEIMER'S DISEASE DOWNREGULATES Bcl-2 AND UPREGULATES BAX EXPRESSION IN HUMAN NEURONS*. J NEUROSCI, 1996. 16(23): p. 7533-9.
249. TAMAGNO, E., ET AL., *H2O2 AND 4-HYDROXYNONENAL MEDiate AMYLOID BETA-INDUCED NEURONAL APOPTOSIS BY ACTIVATING JNKs AND p38MAPK*. EXP NEUROL, 2003. 180(2): p. 144-55.
250. KUSIAK, J.W., J.A. IZZO, AND B. ZHAO, *NEURODEGENERATION IN ALZHEIMER DISEASE. IS APOPTOSIS INVOLVED?* MOL CHEM NEUROPATHOL, 1996. 28(1-3): p. 153-62.
251. ANDERSON, A.J., ET AL., *MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASSESSMENT OF DNA DAMAGE AND APOPTOSIS IN DOWN SYNDROME AND ALZHEIMER DISEASE, AND EFFECT OF POSTMORTEM TISSUE ARCHIVAL ON TUNEL*. NEUROBIOL AGING, 2000. 21(4): p. 511-24.

252. SU, J.H., ET AL., *IMMUNOHISTOCHEMICAL EVIDENCE FOR APOPTOSIS IN ALZHEIMER'S DISEASE*. NEUROREPORT, 1994. 5(18): p. 2529-33.
253. CHUI, D.H., ET AL., *APOPTOTIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE FREQUENTLY SHOW INTRACELLULAR ABETA42 LABELING*. J ALZHEIMERS Dis, 2001. 3(2): p. 231-239.
254. MATSUI, T., ET AL., *COORDINATED EXPRESSION OF CASPASE 8, 3 AND 7 mRNA IN TEMPORAL CORTEX OF ALZHEIMER DISEASE: RELATIONSHIP TO FORMIC ACID EXTRACTABLE ABETA42 LEVELS*. J NEUROPATHOL EXP NEUROL, 2006. 65(5): p. 508-15.
255. BACH, J.H., ET AL., *C-TERMINAL FRAGMENT OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN INDUCES ASTROCYTOSIS*. J NEUROCHEM, 2001. 78(1): p. 109-20.
256. DUMANCHIN-NJOCK, C., ET AL., *THE CASPASE-DERIVED C-TERMINAL FRAGMENT OF BETAAPP INDUCES CASPASE-INDEPENDENT TOXICITY AND TRIGGERS SELECTIVE INCREASE OF ABETA42 IN MAMMALIAN CELLS*. J NEUROCHEM, 2001. 78(5): p. 1153-61.
257. LU, D.C., ET AL., *A SECOND CYTOTOXIC PROTEOLYTIC PEPTIDE DERIVED FROM AMYLOID BETA-PROTEIN PRECURSOR*. NAT MED, 2000. 6(4): p. 397-404.
258. NING, A., ET AL., *AMYLOID-BETA DEPOSITS LEAD TO RETINAL DEGENERATION IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER DISEASE*. INVEST OPHTHALMOL Vis Sci, 2008. 49(11): p. 5136-43.
259. CENINI, G., ET AL., *ELEVATED LEVELS OF PRO-APOPTOTIC P53 AND ITS OXIDATIVE MODIFICATION BY THE LIPID PEROXIDATION PRODUCT, HNE, IN BRAIN FROM SUBJECTS WITH AMNESTIC MILD COGNITIVE IMPAIRMENT AND ALZHEIMER'S DISEASE*. J CELL MOL MED, 2008. 12(3): p. 987-94.
260. DE LA MONTE, S.M., Y.K. SOHN, AND J.R. WANDS, *CORRELATES OF P53- AND Fas (CD95)-MEDIATED APOPTOSIS IN ALZHEIMER'S DISEASE*. J NEUROL SCI, 1997. 152(1): p. 73-83.
261. HOOPER, C., ET AL., *P53 IS UPREGULATED IN ALZHEIMER'S DISEASE AND INDUCES TAU PHOSPHORYLATION IN HEK293A CELLS*. NEUROSCI LETT, 2007. 418(1): p. 34-7.
262. KITAMURA, Y., ET AL., *CHANGES OF P53 IN THE BRAINS OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 1997. 232(2): p. 418-21.
263. PARDOSI-PIQUARD, R. AND F. CHECLER, *THE PHYSIOLOGY OF THE BETA-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN INTRACELLULAR DOMAIN AICD*. J NEUROCHEM, 2012. 120 Suppl 1: p. 109-24.
264. ALVES DA COSTA, C., ET AL., *PRESENILIN-DEPENDENT GAMMA-SECRETASE-MEDIATED CONTROL OF P53-ASSOCIATED CELL DEATH IN ALZHEIMER'S DISEASE*. J NEUROSCI, 2006. 26(23): p. 6377-85.
265. CHANDLER, H. AND G. PETERS, *STRESSING THE CELL CYCLE IN SENESCENCE AND AGING*. CURR OPIN CELL BIOL, 2013. 25(6): p. 765-71.
266. CHECLER, F. AND C. ALVES DA COSTA, *P53 IN NEURODEGENERATIVE DISEASES AND BRAIN CANCERS*. PHARMACOL THER, 2014. 142(1): p. 99-113.
267. *BRAIN TUMOUR RISK IN RELATION TO MOBILE TELEPHONE USE: RESULTS OF THE INTERPHONE INTERNATIONAL CASE-CONTROL STUDY*. INT J EPIDEMIOL, 2010. 39(3): p. 675-94.
268. KELLY, P.J., ET AL., *STEREOTACTIC HISTOLOGIC CORRELATIONS OF COMPUTED TOMOGRAPHY- AND MAGNETIC RESONANCE IMAGING-DEFINED ABNORMALITIES IN PATIENTS WITH GLIAL NEOPLASMS*. MAYO CLIN PROC, 1987. 62(6): p. 450-9.
269. DAUMAS-DUPORE, C., ET AL., *[GLIOMAS: WHO AND SAINTE-ANNE HOSPITAL CLASSIFICATIONS]*. ANN PATHOL, 2000. 20(5): p. 413-28.
270. VARLET, P., ET AL., *NEW VARIANTS OF MALIGNANT GLIONEURONAL TUMORS: A CLINICOPATHOLOGICAL STUDY OF 40 CASES*. NEUROSURGERY, 2004. 55(6): p. 1377-91; DISCUSSION 1391-2.
271. LOUIS, D.N., ET AL., *THE 2007 WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM*. ACTA NEUROPATHOL, 2007. 114(2): p. 97-109.
272. HANAHAN, D. AND R.A. WEINBERG, *HALLMARKS OF CANCER: THE NEXT GENERATION*. CELL, 2011. 144(5): p. 646-74.
273. IGNATOVA, T.N., ET AL., *HUMAN CORTICAL GLIAL TUMORS CONTAIN NEURAL STEM-LIKE CELLS EXPRESSING ASTROGLIAL AND NEURONAL MARKERS IN VITRO*. GLIA, 2002. 39(3): p. 193-206.
274. VISVADER, J.E. AND G.J. LINDEMAN, *CANCER STEM CELLS IN SOLID TUMOURS: ACCUMULATING EVIDENCE AND UNRESOLVED QUESTIONS*. NAT REV CANCER, 2008. 8(10): p. 755-68.
275. PETITJEAN, A., ET AL., *IMPACT OF MUTANT P53 FUNCTIONAL PROPERTIES ON TP53 MUTATION PATTERNS AND TUMOR PHENOTYPE: LESSONS FROM RECENT DEVELOPMENTS IN THE IARC TP53 DATABASE*. HUM MUTAT, 2007. 28(6): p. 622-9.
276. HAGEL, C., ET AL., *DEMONSTRATION OF P53 PROTEIN AND TP53 GENE MUTATIONS IN OLIGODENDROGLIOMAS*. EUR J CANCER, 1996. 32A(13): p. 2242-8.
277. KIM, Y.H., ET AL., *MOLECULAR CLASSIFICATION OF LOW-GRADE DIFFUSE GLIOMAS*. AM J PATHOL, 2010. 177(6): p. 2708-14.
278. MENDRYSA, S.M., ET AL., *AN INTEGRATED GENETIC-GENOMIC APPROACH FOR THE IDENTIFICATION OF NOVEL CANCER LOCI IN MICE SENSITIZED TO C-MYC-INDUCED APOPTOSIS*. GENES CANCER, 2010. 1(5): p. 465-479.
279. PARSONS, D.W., ET AL., *AN INTEGRATED GENOMIC ANALYSIS OF HUMAN GLIOBLASTOMA MULTIFORME*. SCIENCE, 2008. 321(5897): p. 1807-12.
280. ZHENG, H., ET AL., *PTEN AND P53 CONVERGE ON C-MYC TO CONTROL DIFFERENTIATION, SELF-RENEWAL, AND TRANSFORMATION OF NORMAL AND NEOPLASTIC STEM CELLS IN GLIOBLASTOMA*. COLD SPRING HARB SYMP QUANT BIOL, 2008. 73: p. 427-37.
281. OHGAKI, H., ET AL., *GENETIC PATHWAYS TO GLIOBLASTOMA: A POPULATION-BASED STUDY*. CANCER RES, 2004. 64(19): p. 6892-9.

282. LEE, M.K. AND K. SABAPATHY, *THE R246S HOT-SPOT P53 MUTANT EXERTS DOMINANT-NEGATIVE EFFECTS IN EMBRYONIC STEM CELLS IN VITRO AND IN VIVO*. J CELL SCI, 2008. 121(Pt 11): p. 1899-906.
283. OREN, M., *P53: THE ULTIMATE TUMOR SUPPRESSOR GENE?* FASEB J, 1992. 6(13): p. 3169-76.
284. WALDMAN, Y.Y., ET AL., *TP53 CANCEROUS MUTATIONS EXHIBIT SELECTION FOR TRANSLATION EFFICIENCY*. CANCER RES, 2009. 69(22): p. 8807-13.
285. REIFENBERGER, J., ET AL., *ANALYSIS OF P53 MUTATION AND EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR AMPLIFICATION IN RECURRENT GLIOMAS WITH MALIGNANT PROGRESSION*. J NEUROPATHOL EXP NEUROL, 1996. 55(7): p. 822-31.
286. RAO, S.K., ET AL., *A SURVEY OF GLIOBLASTOMA GENOMIC AMPLIFICATIONS AND DELETIONS*. J NEUROONCOL. 96(2): p. 169-79.
287. RIEMENSCHNEIDER, M.J., ET AL., *AMPLIFICATION AND OVEREXPRESSION OF THE MDM4 (MDMX) GENE FROM 1q32 IN A SUBSET OF MALIGNANT GLIOMAS WITHOUT TP53 MUTATION OR MDM2 AMPLIFICATION*. CANCER RES, 1999. 59(24): p. 6091-6.
288. KAMIJO, T., ET AL., *FUNCTIONAL AND PHYSICAL INTERACTIONS OF THE ARF TUMOR SUPPRESSOR WITH P53 AND MDM2*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1998. 95(14): p. 8292-7.
289. ZHANG, Y., Y. XIONG, AND W.G. YARBROUGH, *ARF PROMOTES MDM2 DEGRADATION AND STABILIZES P53: ARF-INK4A LOCUS DELETION IMPAIRS BOTH THE Rb AND P53 TUMOR SUPPRESSION PATHWAYS*. CELL, 1998. 92(6): p. 725-34.
290. NAKAMURA, M., ET AL., *P14ARF DELETION AND METHYLATION IN GENETIC PATHWAYS TO GLIOBLASTOMAS*. BRAIN PATHOL, 2001. 11(2): p. 159-68.
291. HENSON, J.W., ET AL., *THE RETINOBLASTOMA GENE IS INVOLVED IN MALIGNANT PROGRESSION OF ASTROCYTOMAS*. ANN NEUROL, 1994. 36(5): p. 714-21.
292. *COMPREHENSIVE GENOMIC CHARACTERIZATION DEFINES HUMAN GLIOBLASTOMA GENES AND CORE PATHWAYS*. NATURE, 2008. 455(7216): p. 1061-8.
293. AKHAVAN, D., T.F. CLOUGHESY, AND P.S. MISCHER, *MTOR SIGNALING IN GLIOBLASTOMA: LESSONS LEARNED FROM BENCH TO BEDSIDE*. NEURO ONCOL, 2010. 12(8): p. 882-9.
294. NETWORK, T.C., *CORRIGENDUM: COMPREHENSIVE GENOMIC CHARACTERIZATION DEFINES HUMAN GLIOBLASTOMA GENES AND CORE PATHWAYS*. NATURE, 2013. 494(7438): p. 506.
295. PAPLOMATA, E. AND R. O'REGAN, *THE PI3K/AKT/MTOR PATHWAY IN BREAST CANCER: TARGETS, TRIALS AND BIOMARKERS*. THER ADV MED ONCOL, 2014. 6(4): p. 154-66.
296. ZHI, Y.H., ET AL., *SUPPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-2 VIA RNA INTERFERENCE INHIBITS PANCREATIC CARCINOMA CELL INVASIVENESS AND ADHESION*. WORLD J GASTROENTEROL, 2009. 15(9): p. 1072-8.
297. PERAUD, A., ET AL., *P53 MUTATIONS VERSUS EGF RECEPTOR EXPRESSION IN GIANT CELL GLIOBLASTOMAS*. J NEUROPATHOL EXP NEUROL, 1997. 56(11): p. 1236-41.
298. WATANABE, K., ET AL., *OVEREXPRESSION OF THE EGF RECEPTOR AND P53 MUTATIONS ARE MUTUALLY EXCLUSIVE IN THE EVOLUTION OF PRIMARY AND SECONDARY GLIOBLASTOMAS*. BRAIN PATHOL, 1996. 6(3): p. 217-23; DISCUSSION 23-4.
299. WONG, A.J., ET AL., *STRUCTURAL ALTERATIONS OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR GENE IN HUMAN GLIOMAS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1992. 89(7): p. 2965-9.
300. STAMBOLIC, V., ET AL., *NEGATIVE REGULATION OF PKB/AKT-DEPENDENT CELL SURVIVAL BY THE TUMOR SUPPRESSOR PTEN*. CELL, 1998. 95(1): p. 29-39.
301. CERAMI, E., ET AL., *THE cBio CANCER GENOMICS PORTAL: AN OPEN PLATFORM FOR EXPLORING MULTIDIMENSIONAL CANCER GENOMICS DATA*. CANCER DISCOV, 2012. 2(5): p. 401-4.
302. GAO, J., ET AL., *INTEGRATIVE ANALYSIS OF COMPLEX CANCER GENOMICS AND CLINICAL PROFILES USING THE cBioPORTAL*. SCI SIGNAL, 2013. 6(269): p. PL1.
303. CESARI, R., ET AL., *PARKIN, A GENE IMPLICATED IN AUTOSOMAL RECESSIVE JUVENILE PARKINSONISM, IS A CANDIDATE TUMOR SUPPRESSOR GENE ON CHROMOSOME 6q25-q27*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2003. 100(10): p. 5956-61.
304. TOMA, M.I., ET AL., *LOSS OF HETEROZYGOSITY AND COPY NUMBER ABNORMALITY IN CLEAR CELL RENAL CELL CARCINOMA DISCOVERED BY HIGH-DENSITY AFFYMETRIX 10K SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM MAPPING ARRAY*. NEOPLASIA, 2008. 10(7): p. 634-42.
305. IWAKAWA, R., ET AL., *CONTRIBUTION OF GERMLINE MUTATIONS TO PARK2 GENE INACTIVATION IN LUNG ADENOCARCINOMA*. GENES CHROMOSOMES CANCER, 2012. 51(5): p. 462-72.
306. PICCHIO, M.C., ET AL., *ALTERATIONS OF THE TUMOR SUPPRESSOR GENE PARKIN IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER*. CLIN CANCER RES, 2004. 10(8): p. 2720-4.
307. AGIRRE, X., ET AL., *ABNORMAL METHYLATION OF THE COMMON PARK2 AND PACRG PROMOTER IS ASSOCIATED WITH DOWNREGULATION OF GENE EXPRESSION IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND CHRONIC MYELOID LEUKEMIA*. INT J CANCER, 2006. 118(8): p. 1945-53.
308. POULOGIANNIS, G., ET AL., *PARK2 DELETIONS OCCUR FREQUENTLY IN SPORADIC COLORECTAL CANCER AND ACCELERATE ADENOMA DEVELOPMENT IN APC MUTANT MICE*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2010. 107(34): p. 15145-50.
309. DENISON, S.R., ET AL., *CHARACTERIZATION OF FRA6E AND ITS POTENTIAL ROLE IN AUTOSOMAL RECESSIVE JUVENILE PARKINSONISM AND OVARIAN CANCER*. GENES CHROMOSOMES CANCER, 2003. 38(1): p. 40-52.
310. WANG, F., ET AL., *PARKIN GENE ALTERATIONS IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA*. GENES CHROMOSOMES CANCER, 2004. 40(2): p. 85-96.
311. LETESSIER, A., ET AL., *CORRELATED BREAK AT PARK2/FRA6E AND LOSS OF AF-6/AFADIN PROTEIN EXPRESSION ARE ASSOCIATED WITH POOR OUTCOME IN BREAST CANCER*. ONCOGENE, 2007. 26(2): p. 298-307.

312. TOMA, M.I., ET AL., *PARK2 AND PACRG ARE COMMONLY DOWNREGULATED IN CLEAR-CELL RENAL CELL CARCINOMA AND ARE ASSOCIATED WITH AGGRESSIVE DISEASE AND POOR CLINICAL OUTCOME*. GENES CHROMOSOMES CANCER, 2013. 52(3): p. 265-73.
313. KAVERINA, I. AND A. STRAUBE, *REGULATION OF CELL MIGRATION BY DYNAMIC MICROTUBULES*. SEMIN CELL DEV BIOL, 2011. 22(9): p. 968-74.
314. WATANABE, T., J. NORITAKE, AND K. KAIBUCHI, *REGULATION OF MICROTUBULES IN CELL MIGRATION*. TRENDS CELL BIOL, 2005. 15(2): p. 76-83.
315. ZHANG, C., ET AL., *PARKIN, A P53 TARGET GENE, MEDIATES THE ROLE OF P53 IN GLUCOSE METABOLISM AND THE WARBURG EFFECT*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2011. 108(39): p. 16259-64.
316. FALLON, L., ET AL., *A REGULATED INTERACTION WITH THE UIM PROTEIN Eps15 IMPLICATES PARKIN IN EGF RECEPTOR TRAFFICKING AND PI(3)K-AKT SIGNALLING*. NAT CELL BIOL, 2006. 8(8): p. 834-42.
317. XU, L., ET AL., *AN EMERGING ROLE OF PARK2 IN CANCER*. J MOL MED (BERL), 2014. 92(1): p. 31-42.
318. VEERIAH, S., ET AL., *SOMATIC MUTATIONS OF THE PARKINSON'S DISEASE-ASSOCIATED GENE PARK2 IN GLIOBLASTOMA AND OTHER HUMAN MALIGNANCIES*. NAT GENET, 2010. 42(1): p. 77-82.
319. D'AMELIO, M., ET AL., *TUMOR DIAGNOSIS PRECEDING PARKINSON'S DISEASE: A CASE-CONTROL STUDY*. MOV DISORD, 2004. 19(7): p. 807-11.
320. VANACORE, N., ET AL., *MORTALITY CANCER RISK IN PARKINSONIAN PATIENTS: A POPULATION-BASED STUDY*. NEUROLOGY, 1999. 52(2): p. 395-8.
321. SEVALLE, J., ET AL., *PHARMACOLOGICAL EVIDENCES FOR DFK167-SENSITIVE PRESENILIN-INDEPENDENT GAMMA-SECRETASE-LIKE ACTIVITY*. J NEUROCHEM, 2009. 110(1): p. 275-83.
322. PASTORCIC, M. AND H.K. DAS, *REGULATION OF TRANSCRIPTION OF THE HUMAN PRESENILIN-1 GENE BY ETS TRANSCRIPTION FACTORS AND THE P53 PROTOONCOGENE*. J BIOL CHEM, 2000. 275(45): p. 34938-45.
323. ROPERCH, J.P., ET AL., *INHIBITION OF PRESENILIN 1 EXPRESSION IS PROMOTED BY P53 AND P21WAF-1 AND RESULTS IN APOPTOSIS AND TUMOR SUPPRESSION*. NAT MED, 1998. 4(7): p. 835-8.
324. ALVES DA COSTA, C., ET AL., *WILD-TYPE AND MUTATED PRESENILINS 2 TRIGGER P53-DEPENDENT APOPTOSIS AND DOWN-REGULATE PRESENILIN 1 EXPRESSION IN HEK293 HUMAN CELLS AND IN MURINE NEURONS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 2002. 99(6): p. 4043-8.
325. KANG, D.E., ET AL., *PRESENILINS MEDIATE PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE/AKT AND ERK ACTIVATION VIA SELECT SIGNALING RECEPTORS. SELECTIVITY OF PS2 IN PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR SIGNALING*. J BIOL CHEM, 2005. 280(36): p. 31537-47.
326. YOSHIDA, H., ET AL., *XBP1 mRNA IS INDUCED BY ATF6 AND SPLICED BY IRE1 IN RESPONSE TO ER STRESS TO PRODUCE A HIGHLY ACTIVE TRANSCRIPTION FACTOR*. CELL, 2001. 107(7): p. 881-91.
327. CROSS, B.C., ET AL., *THE MOLECULAR BASIS FOR SELECTIVE INHIBITION OF UNCONVENTIONAL mRNA SPLICING BY AN IRE1-BINDING SMALL MOLECULE*. PROC NATL ACAD SCI U S A. 109(15): p. E869-78.
328. CORTI, O., S. LESAGE, AND A. BRICE, *WHAT GENETICS TELLS US ABOUT THE CAUSES AND MECHANISMS OF PARKINSON'S DISEASE*. PHYSIOL REV, 2011. 91(4): p. 1161-218.
329. BURNS, M.P., ET AL., *PARKIN PROMOTES INTRACELLULAR ABETA1-42 CLEARANCE*. HUM MOL GENET, 2009. 18(17): p. 3206-16.
330. TAKASUGI, N., ET AL., *THE ROLE OF PRESENILIN COFACTORS IN THE GAMMA-SECRETASE COMPLEX*. NATURE, 2003. 422(6930): p. 438-41.
331. WITTE, M.E., ET AL., *PARKINSON'S DISEASE-ASSOCIATED PARKIN COLOCALIZES WITH ALZHEIMER'S DISEASE AND MULTIPLE SCLEROSIS BRAIN LESIONS*. NEUROBIOL DIS, 2009. 36(3): p. 445-52.
332. SERGEANT, N., ET AL., *BIOCHEMISTRY OF TAU IN ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED NEUROLOGICAL DISORDERS*. EXPERT REV PROTEOMICS, 2008. 5(2): p. 207-24.
333. KUPERSTEIN, I., ET AL., *NEUROTOXICITY OF ALZHEIMER'S DISEASE ABETA PEPTIDES IS INDUCED BY SMALL CHANGES IN THE ABETA42 TO ABETA40 RATIO*. EMBO J, 2010. 29(19): p. 3408-20.
334. YOKOTA, T., ET AL., *DOWN REGULATION OF DJ-1 ENHANCES CELL DEATH BY OXIDATIVE STRESS, ER STRESS, AND PROTEASOME INHIBITION*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 2003. 312(4): p. 1342-8.
335. SADO, M., ET AL., *PROTECTIVE EFFECT AGAINST PARKINSON'S DISEASE-RELATED INSULTS THROUGH THE ACTIVATION OF XBP1*. BRAIN RES, 2009. 1257: p. 16-24.
336. KUMARAN, R., ET AL., *DJ-1 (PARK7) IS ASSOCIATED WITH 3R AND 4R TAU NEURONAL AND GLIAL INCLUSIONS IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS*. NEUROBIOL DIS, 2007. 28(1): p. 122-32.