

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

Dottorato di ricerca in Neurobiologia

XXIII CICLO



**RUOLO DEI RECETTORI DEL KAINATO NELLA
PATOGENESI DELLA MALATTIA DI PARKINSON**

TUTORE: Prof. Riccardo FESCE

CO-TUTORE: Prof. Vincenzo SILANI

Tesi di Dottorato di:

Chiara **ASCARDI**

matricola N. 708049

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO.1- LA MALATTIA DI PARKINSON	Pagina 4
<i>1.1 Generalità e manifestazioni cliniche</i>	Pagina 4
<i>1.2 Patologia sporadica o ereditaria?</i>	Pagina 6
<i>1.3 Malattia di parkinson: dalle forme monogeniche ai fattori di suscettibilità genetica</i>	Pagina 6
CAPITOLO.2 PARKINA	Pagina 11
<i>2.1 Autosomal Recessive - Juvenile Parkinsonism (PARK2)</i>	Pagina 11
<i>2.2 Caratteristiche strutturali e funzionali</i>	Pagina 13
<i>2.3 Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e la parkina come enzima E3</i>	Pagina 15
CAPITOLO.3 PARKINA E MALATTIA DI PARKINSON	Pagina 17
<i>3.1a Aggregazione proteica e neurodegenerazione</i>	Pagina 18
<i>3.1b Substrati della parkina</i>	Pagina 19
<i>3.2 Parkina e neuroprotezione</i>	Pagina 22
<i>3.3 Parkina e funzione mitocondriale</i>	Pagina 24
<i>3.4 La parkina nella plasticità sinaptica</i>	Pagina 25
SCOPO DEL LAVORO	Pagina 27
MATERIALI E METODI	Pagina 30
RISULTATI	Pagina 38

DISCUSSIONE

Pagina 49

FIGURE

Pagina 58

BIBLIOGRAFIA

Pagina 71

INTRODUZIONE

1. LA MALATTIA DI PARKINSON

1.1 Generalità e manifestazioni cliniche

La *malattia di Parkinson* (PD) è una frequente patologia neurodegenerativa dell'età adulta, seconda in diffusione solo alla malattia di Alzheimer. È associata ad una progressiva e selettiva perdita dei neuroni dopaminergici, i cui corpi cellulari risiedono nella *substantia nigra pars compacta* (SNpc) del sistema nervoso centrale (SNC), mentre gli assoni ed i terminali nervosi proiettano verso lo striato (Dauer and Przedborski, 2003), componente centrale dei gangli della base e responsabile dell'inizio e del controllo del movimento.

Le statistiche epidemiologiche dichiarano che, ogni anno, la diagnosi di PD interessa 16-19 persone su 100.000; la prevalenza della patologia è associata all'età: colpisce circa l'1% della popolazione sessantacinquenne, mentre a 85 anni la percentuale sale al 4-5% (Fahn, 2003). L'età media di insorgenza è di 70 anni, anche se circa il 4% dei pazienti sviluppa una forma precoce prima dei 50 (Van Den Eeden et al., 2003).

Tipicamente l'esordio della patologia è insidioso e si presenta in modo asimmetrico. Il principale sintomo clinico è il parkinsonismo (caratteristico non solo del PD, ma anche di altre forme neurodegenerative), ovvero un disordine del movimento caratterizzato da tremore a riposo, bradicinesia (lentezza nel compimento dei movimenti volontari), rigidità ed instabilità posturale (Fahn, 2003). Al parkinsonismo si aggiungono una progressiva compromissione delle funzioni cognitive e disturbi psichiatrici (di solito depressione).

Diverse sono le regioni del SNC coinvolte nel controllo motorio. I movimenti volontari iniziano nella corteccia motoria che convoglia i segnali efferenti al tronco encefalo (mesencefalo, ponte e midollo allungato) e al midollo spinale attraverso diverse regioni sub-corticali, tra cui talamo, striato (insieme di caudato e putamen) e nuclei subtalami. Tali regioni sub-corticali insieme alla SNpc costituiscono i gangli della base.

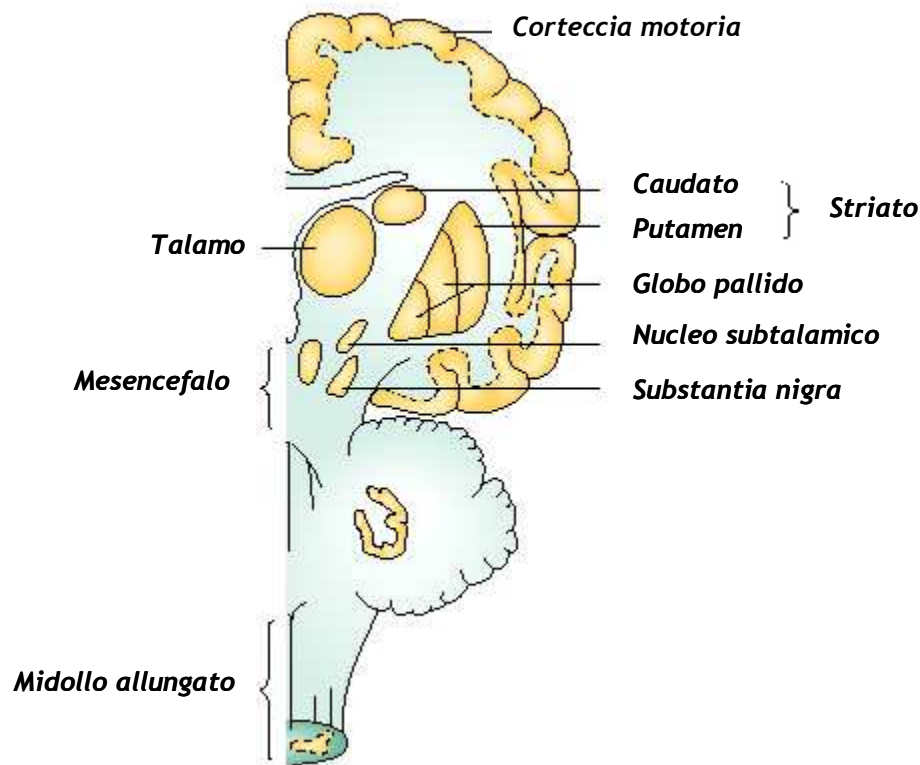


Figura A – Principali regioni del SNC coinvolte nella malattia di Parkinson.

I sintomi clinici, che caratterizzano il PD, risultano dalla deplezione di dopamina (DA) nello striato (conseguente all'irreversibile e progressiva degenerazione dei neuroni che producono tale neurotrasmettitore) e sono associati a scariche neuronali (“neuronal firing”) aumentate e disordinate con perdita di sincronizzazione dei gangli della base. È importante sottolineare che la degenerazione neuronale nel PD non si limita alla *substantia nigra* o ai neuroni dopaminergici, ma tende ad estendersi man mano che la patologia avanza, in contrasto con alcune forme di parkinsonismo (Farrer, 2001). Probabilmente la diffusione del danno anche ad altri fenotipi neuronali è correlata a meccanismi e vie cellulari comuni anche ad altre patologie neurodegenerative. Purtroppo resta ancora da capire il processo alla base della perdita di specifiche sottopopolazioni cellulari, caratteristicamente riscontrata nelle diverse malattie.

Non tutti i pazienti che manifestano parkinsonismo sono affetti da PD, infatti circa l'80% di essi riceve diagnosi di “possibile o probabile” Parkinson. La classificazione definitiva della patologia richiede evidenze *post-mortem*, quali perdita neuronale, depigmentazione della *substantia nigra* (i neuroni dopaminergici contengono infatti

neuromelanina) e presenza dei corpi di Lewy (aggregati proteici intracitoplasmatici) (Hughes et al., 2002).

1.2 Patologia sporadica o ereditaria?

L'origine sporadica del PD è sempre stata considerata criterio fondamentale per la classificazione della patologia, al punto che forme familiari di parkinsonismo venivano escluse a priori dalla diagnosi di PD. Nonostante una base ereditaria sia stata inizialmente considerata poco probabile, recenti studi hanno dimostrato l'implicazione di geni causativi e di suscettibilità.

La precedente esclusione di un coinvolgimento genetico sembra essere dovuta alla variabile penetranza riscontrata per taluni geni come estensivamente trattato da Farrer (Farrer, 2006) e da Nagatsu (Nagatsu and Sawada, 2006).

Oggi le statistiche indicano che, nel 95% dei casi, la malattia non è correlata a cause genetiche (PD sporadico o sPD); sembrano piuttosto essere coinvolti fattori di rischio ambientali esogeni ed endogeni, come neurotossine e pesticidi, anche se non si può escludere la suscettibilità genetica (Farrer, 2006). Nel rimanente 5% la patologia è ereditaria (PD familiare o fPD) (Dauer and Przedborski, 2003).

1.3 Malattia di Parkinson: dalle forme monogeniche ai fattori di suscettibilità genetica

Negli ultimi 10 anni la ricerca nella genetica della malattia di Parkinson è stata estremamente prolifica. Più di 13 loci e 9 geni sono stati identificati, ma la loro implicazione nella malattia non risulta sempre certa. I loci e i geni identificati vengono associati sia con PD autosomico dominante (PARK1 E PARK4/ α -synucleina; PARK5/UCHL1; PARK8/LRRK2; PARK11/GIGYF2; PARK13/Omi/Htra2) che autosomico recessivo (PARK2/Parkin; PARK6/PINK1; PARK7/DJ-1; PARK9/ATP13A2).

MUTAZIONI AUTOSOMICHE DOMINANTI

a) *PARK1- e PARK4-linked PD: α -Synucleina (SNCA)*

Gli studi genetici di PD iniziarono con la scoperta di mutazioni patogeniche missenso nel gene SNCA che codifica per l' α -synucleina, una proteina che è espressa nel cervello ed ha un potenziale ruolo nell'apprendimento, nella plasticità sinaptica, nel trafficking delle vescicole e nella sintesi di dopamina (Lotharius and Brundin 2002).

L' α -synucleina è composta da 140 aminoacidi, il cui N-terminale forma un dominio anfipatico quando la proteina si associa ai lipidi. La proteina wild-type è un potente inibitore della fosfolipasi D2, che assolve diverse funzioni nella trasduzione del segnale, trasporto delle vescicole in membrana e prende parte alle dinamiche del citoscheletro. La proteina inoltre è un inibitore competitivo della tirosina idrossilasi, l'enzima limitante nel processo di biosintesi della L-DOPA a partire dalla tirosina.

Dall'identificazione delle mutazioni missenso, sono state scoperte duplicazioni genomiche in famiglie con PD e in famiglie affette da parkinsonismo con demenza che si manifesta come *malattia a corpi di Lewy diffusi* (DLBD) all'esame autoptico (Singleton et al., 2003).

La scoperta delle mutazioni SNCA ha così contribuito alla chiarezza sulla controversia qualora le malattie a corpi di Lewy come il PD, i parkinsonismi con demenza e la demenza a corpi di Lewy rappresentassero un *continuum* o dovessero essere considerate come malattie distinte. Farmacologicamente ci sono importanti differenze nelle strategie di trattamento per i pazienti con PD e DLB (Poewe, W. 2005), ma la scoperta di mutazioni SNCA suggerisce un'ipotesi unificante per l'eziologia di questi disordini.

b) *PARK5-linked PD: Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 (UCH-L1)*

La mutazione dominante (I93M) è stata identificata in una famiglia con PD ereditario (Leroy et al., 1998) nel gene che codifica per un enzima (UCH-L1) che catalizza l'idrolisi del C-terminale ubiquitinil estere e che si pensa possa giocare un ruolo nel riciclo dell'ubiquitina legata alle proteine *misfolded* in seguito alla loro degradazione ad opera del proteasoma. Sebbene la mutazione I93M diminuisce l'attività di questo enzima de-

ubiquitinante, i topi privi di UCH-L1 non presentano neurodegenerazione dopaminergica. Inoltre un polimorfismo (S18Y) di UCH-L1 sembra essere protettivo per lo sviluppo di PD (Maraganore et al., 1999). Oltre alla sua funzione deubiquitinante, UCH-L1 assume un'attività precedentemente riconosciuta di ubiquitin ligasi in seguito a dimerizzazione (Liu et al., 2002). Sia la mutazione I93M che il polimorfismo S18Y alterano l'attività ligasica in modo consistente con l'ipotesi che un'impedita attività del sistema ubiquitina-proteasoma è critica per la patogenesi del PD: l'attività dell' UCH-L1 ligasi è diminuita dalla mutazione patogenica I93M e aumentata dal polimorfismo protettivo S18Y (Liu et al., 2002).

b) PARK8-linked PD: leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)

Il locus PARK8 è stato originariamente mappato come tratto autosomico dominante in una famiglia giapponese con PD asimmetrico, L-DOPA responsivo ad esordio tardivo (Funayama et al 2002).

Il trascritto LRRK2 codifica per una proteina di 2527 aminoacidi che contiene 5 domini C-terminali conservati, che potrebbero essere coinvolti in multiple funzioni, incluso il legame con il substrato, la fosforilazione delle proteine e l'interazione proteina-proteina. La frequente mutazione Gly2019Ser e le adiacenti sostituzioni Ile2020Thr sembrano provocare l' aumento dell'attività catalitica del dominio MAPKKK (West et al 2005). LRRK2 è espressa in molte regioni del cervello, incluse la substantia nigra, il nucleo caudato e il putamen. Tuttavia al contrario dell' α -synucleina, l'immunocitochimica della LRRK2 non presenta alcuna lesione neurodegenerativa specifica e non è chiaro come le sostituzioni nucleotidiche siano in grado di provocare la neuropatologia. Infine si ipotizza che LRRK2 sia un membro della famiglia delle RIP kinasi, essenziali sensori dello stress cellulare (Meylan and Tschopp 2005). Queste proteine prendono parte a diverse funzioni essenziali per l'avvio di specifiche risposte quali sopravvivenza cellulare, infiammazione o programmi di morte cellulare che sono mediati dai *pathways* delle proteine JNK, ERK, p38 e NF-kB. Tuttavia la relazione tra la patogenesi di LRRK2, il parkinsonismo e la fase finale della malattia restano enigmatici e sono ipotizzabili molte vie d'azione. Inoltre ulteriori studi funzionali e genetici sono necessari per identificare i

modificatori genetici e ambientali di LRRK2 che influenzano sia l'età d'insorgenza che le disparate manifestazioni cliniche e patologiche.

c) PARK11-linked PD: GRB10-interacting GYF protein 2 (GIGYF2)

Recentemente è stato proposto che la proteina GIGYF2, anche chiamata TNRC15 (Trinucleotide Repeat Containing 15) è mappata al locus PARK11, precedentemente identificato da un'analisi di linkage in una popolazione di PD familiare (Pankratz et al., 2002). In due popolazioni di PD familiare di cui una francese e una italiana, 10 mutazioni in 16 pazienti non correlati sono state trovate nella forma più corta di GIGYF2 per una frequenza mutazionale di 6.4 % (Lautier et al., 2008). GIGYF2 contiene il motivo GYF che si lega ad una proteina adattatore ricca di prolina chiamata Grb10 e potenzialmente regola le risposte cellulari all'insulina e al fattore di crescita simile all'insulina. Sono state trovate mutazioni non causative di malattia in altre popolazioni Europee soprattutto in casi di PD sporadico (Bras et al., 2009).

d) PARK 13-linked PD: Omi/Htra2

Omi/Htra2, una serin-proteasi localizzata nei mitocondri che viene rilasciata nel citosol durante l'apoptosi, è stata implicata nella patogenesi del PD sulla base di evidenze biologiche e genetiche (Strauss et al., 2005). Il topo Omi/Htra2 knock-out e quello mutante presentano infatti un fenotipo neurodegenerativo parkinsoniano. La proteasi inoltre presenta un residuo che può essere fosforilato dalla PINK1 e nei pazienti con mutazioni di quest'ultima la fosforilazione è diminuita a livello cerebrale (Plun-Favreau et al., 2007).

MUTAZIONI AUTOSOMICHE RECESSIVE

e) PARK6-linked PD: PTEN-induced kinase 1

Mutazioni recessive in omozigosi ed eterozigosi composte in PINK1 sono state identificate nell' 1-2 % della malattia ad esordio giovanile. PINK1 contiene 8 esoni che occupano 1.8 kb e codificano per 581 aminoacidi. Il trascritto è espresso in maniera ubiquitaria e codifica per una proteina che contiene un motivo di destinazione mitocondriale e un dominio protein kinasico altamente conservato comune alla famiglia Ca^{2+} /calmodulina di chinasi serina-treonina. Mutazioni in PINK1 hanno effetti differenziali sulla stabilità proteica, la localizzazione e l'attività chinastica (Petit et al., 2005).

f) PARK7-linked PD: Oncogene DJ1

DJ1 contiene 8 esoni che occupano 24 kb ed è localizzato vicino a PINK1. Le delezioni e le mutazioni missenso sono state identificate in studi di linkage su famiglie, ma sono rare e causative di meno dell' 1% del parkinsonismo ad esordio giovanile (Lockhart et al., 2004). La proteina DJ1 è un membro della famiglia di chaperoni ThiJ/PfpI, che sono indotti durante lo stress ossidativo e che esistono come dimero localizzato nei mitocondri. Nel topo, DJ1 sembra avere un ruolo essenziale nella trasmissione dopaminergica neuronale mediata dal recettore della dopamina D2 (Goldberg et al., 2005). Nell'uomo i portatori di mutazione clinicamente non affetti sembrano normali anche negli studi di neuroimaging, indicando che per la malattia è richiesta una completa perdita di funzione della proteina (Dekker et al., 2004).

g) PARK9-linked PD: ATP13A2

ATP13A2 è il gene causativo nel locus PARK9, mappato in una famiglia Giordana e Cilena con la sindrome di Kufor-Rakeb (KRS), un parkinsonismo recessivo ad esordio giovanile con degenerazione piramidale e disfunzioni cognitive (Najim al-Din et al., 1994). Questo presenta mutazioni in omozigosi (552LfsX788) ed eterozigosi composta (c.1305 + 5G>A/1019GfsX1021) che causano la ritenzione e la degradazione da parte

del proteasoma di proteine tronche nel reticolo endoplasmatico invece che l'inserzione nella membrana lisosomale (Ramirez et al.,2006). ATP13A2 codifica per una grossa ATPasi di tipo P di 1180 aminoacidi e 10 domini transmembrana il cui cattivo funzionamento è coinvolto anche nella malattia di Gaucher.

Locus/gene	Inheritance	Onset	Pathology	Map position	Gene	Ref.
PARK1	Dominant	40s	nigral degeneration with Lewy-bodies	4q21	α -synuclein	(1)
PARK2	Recessive	20-40	nigral degeneration without Lewy-bodies,	6q25	Parkin	(2)
PARK3	Dominant	60s	nigral degeneration with Lewy-bodies, Plaques and tangles in some	2p13	?	(3)
PARK4	Dominant	30s	nigral degeneration with Lewy-bodies, vacuoles in neurons of the hippocampus	4q21	α -synuclein triplikations and duplications	(4)
PARK5	Dominant	~50	No pathology reported	4p14	ubiquitin C-terminal hydrolase L1	(5)
PARK6	Recessive	30-40	No pathology reported	1p35-37	PINK1	(6)
PARK7	Recessive	30-40	No pathology reported	1p38	DJ-1	(7)
PARK8	Dominant	~60	Variable α -synuclein and tau pathology	12 cen	LRRK2	(8)
PARK9	Recessive	20-40	No pathology reported	1p36	ATP13A2	(9)
PARK10	Dominant (?)	50-60	No pathology reported	1p32	?	(10)
PARK11	Dominant (?)	late	No pathology reported	2q34	?	(11)
PARK12	X-linked	late	No pathology reported	Zq21	?	(12)
PARK13	Dominant (?)	late	No pathology reported	2p12	HTRA2	(13)

Figura B – *Forme mendeliane di malattia di Parkinson.*

2. PARKINA

2.1 Autosomal Recessive - Juvenile Parkinsonism (PARK2)

Il parkinsonismo autosomico recessivo ad esordio giovanile con flutuazioni diurne (AR-EPDF) rappresenta una clinica e genetica distinta entità che può essere classificata in un sottogruppo di malattia di Parkinson a trasmissione recessiva. AR-EPDF è caratterizzato dall'esordio giovanile (di solito nei vent'anni), parkinsonismo responsivo alla dopamina con la fluttuazione diurna dei sintomi, lieve distonia (soprattutto ai piedi) e tendenza allo sviluppo di discinesia indotta da dopamina. Dal punto di vista patologico, la *substantia nigra pars compacta* e il *locus coeruleus* sono sottoposti a severa degenerazione senza la presenza dei corpi di Lewy. Questa unica entità è stata riportata per la prima volta da

Yamamura et al. nel 1973 mentre Ishikawa e Tsuji indipendentemente hanno riportato 12 famiglie con essenzialmente le stesse caratteristiche cliniche di parkinsonismo giovanile autosomico recessivo (AR-JP). Ma è solo nel 1999 che Kitada et al. riuscirono a mappare il locus per AR-JP/AR-EPDF sul cromosoma 6q25.2-q27 attraverso analisi di linkage e a clonare il gene causativo, codificante per una proteina chiamata *parkina*, attraverso clonaggio posizionale da materiale genetico donato da famiglie Giapponesi affette da queste forme di PD (Kitada et al., 1998).

E' stato dimostrato che AR-JP ha una recessiva modalità di trasmissione cioè la condizione necessaria per l'insorgenza della malattia è la presenza di mutazione su entrambe gli alleli della parkina, della stessa mutazione o anche di mutazioni diverse (in questo caso si parla di mutazione composta) (Mizuno et al., 1998). Fino ad ora circa 379 portatori di mutazione sono stati riportati in 42 diversi studi. Alcune mutazioni sono ricorrenti tra di loro e tra i diversi gruppi etnici (Kitada et al., 1998; Periquet et al., 2003; Periquet et al., 2001). Le mutazioni possono insorgere a partire da un "punto caldo" di mutazione, in cui la frequenza di insorgenza è più alta che in altre zone, o potrebbero rappresentare invece quello che è l'effetto di una mutazione "fondatore". L'origine delle mutazioni è stata anche studiata usando l'analisi aplotipica. Aplotipi divergenti ad un marcatore nella regione PARK2 potrebbe suggerire mutazioni indipendenti (punti caldi di mutazione), mentre aplotipi simili supportano l'ipotesi di un fondatore comune che ha sviluppato la mutazione molte generazioni fa e le ha trasmesse ai suoi discendenti.

In totale 95 diverse mutazioni sono state identificate includendo: 40 riarrangiamenti esonici (26 delezioni e 14 duplicazioni), 43 sostituzioni di singola base e 12 piccole delezioni o inserzioni di una o diverse paia di base. Le mutazioni più comuni sono le delezioni dell'esone 4 (n=28), le delezioni dell'esone 3 e dell'esone 4 (n=23), una mutazione puntiforme nell'esone 7 (924C>T; n=38), e una delezione di singola paia di basi nell'esone 2 (255/256delA; n=17). Queste cinque alterazioni rappresentano il 35 % (133/379) di tutte le mutazioni della parkina. Considerando la distribuzione totale e la frequenza delle mutazioni della parkina, i punti caldi per le piccole mutazioni sembrano essere concentrati negli esoni 2 e 7, e i punti di rottura per i riarrangiamenti esonici sono presenti più frequentemente negli introni 2 e 4 (Hedrich et al., 2004).

Recentemente è stato visto che circa il 50 % delle famiglie europee affette da Parkinsonismo autosomico recessivo hanno mutazioni nel gene della parkina (Abbas et al., 1999; Kitada et al., 2000a; Lucking et al., 2000; Kahle et al., 2000).

Risulta particolare come nei casi di completa assenza della proteina l' AR-JP avviene in completa assenza dei corpi di Lewy (Hayashi et al., 2000; Mori et al., 1998).

Tuttavia, in alcuni casi di AR-JP sono presenti corpi di Lewy, per esempio quando un allele ha una mutazione nulla e l'altro ha una mutazione (R275N) che mostra una parziale attività catalitica della parkina (Farrer et al., 2001). E' interessante come nelle famiglie con PD autosomico dominante l'immunoreattività per la parkina è stata trovata in oltre il 90 % dei corpi di Lewy. Tutte insieme queste osservazioni suggeriscono un ruolo catalitico per l'attività della parkina nella formazione dei corpi di Lewy. Tuttavia se un cambiamento nell'attività della parkina nei corpi di Lewy potrebbe essere anche un fattore contributivo alle forme dominanti di PD non è ancora chiaro.

2.2 Caratteristiche strutturali e funzionali

La proteina parkina appartiene ad una famiglia di proteine con domini conservati simili all'ubiquitina (UBL) e motivi RING finger.

Il gene della parkina è uno dei più grandi nel genoma. La parkina umana ha 12 esoni, codificanti per 465 aminoacidi e con un peso molecolare di ~ 52 kDa e con una struttura intronica super espansa che occupa 1.3 Mb di DNA genomico (Kitada et al., 1998; Shimura et al., 1999). Il locus della parkina (PRKN), adiacente al telomero 6q è altamente ricombinabile ed è prossimo al locus FRA6E, il terzo più comune sito fragile nei tessuti tumorali, sebbene il potenziale ruolo della parkina nel cancro deve essere ancora determinato. Il 50 % dei pazienti che hanno un esordio di malattia al di sotto dei 25 anni presentano mutazioni nel locus PRKN.

La parkina contiene:

1. un ammino-terminale (residui 1-76) di omologia con l'ubiquitina (UHD) che ne condivide il 62 % di omologia e potrebbe essere coinvolto nel riconoscimento del

- substrato (Shimura et al., 2000), nel controllo del livello di espressione del gene , e lega la subunità Rpn10 del proteasoma 26S attraverso la proteina ARG42;
2. un dominio centrale (residui 145-232) a funzione sconosciuta, anche se la sua parziale delezione (residui 58-178) risulta in una perdita di interazione con le proteine UbcH7 e UbcH8 indicandone un possibile ruolo strutturale;
 3. un carbossi terminale (ct) RING box (residui 237-449) coinvolto nel legame con E2 e nel riconoscimento e legame con il substrato;
 4. motivo di legame PDZ responsabile dell'interazione con proteine che contengono domini PDZ.

La parkina, una E3 ubiquitin ligasi, è un componente del sistema ubiquitina/proteasoma ed è coinvolta nella degradazione delle sue proteine substrato, che possono andare da recettori legati alla membrana fino ad enzimi citosolici (Joazeiro and Weissman, 2000). Si pensa la parkina possa agire da “stazione di cattura” mantenendo le proteine substrato nella posizione giusta per la diretta ubiquitinazione da parte dell'enzima E2 Ubiquitina coniugante. La parkina media l'ubiquitinazione dei suoi substrati portandoli alla degradazione (Zhang et al., 2000; Imai et al., 2001). La parkina è una proteina relativamente stabile così che gli inibitori del proteasoma non ne aumentano i livelli. Inoltre è noto come la parkina sia in grado di catalizzare la sua autoubiquitinazione e degradazione da parte del proteasoma in modo da poter regolare i suoi stessi livelli cellulari (Choi et al., 2000; Shimura et al., 2000). Questo suggerisce che una perdita di funzione (data dalla mutazione di entrambe gli alleli) porta all'accumulo tossico delle proteine substrato o della proteina stessa. L'overespressione della parkina è stato visto ridurre i livelli di proteine ubiquitinate (Huynh et al., 2002). D'altra parte, l'overespressione di forme mutate della parkina causano stress ossidativo, eccessiva produzione di NO e portano a morte cellulare, probabilmente attraverso l'inibizione del proteasoma (Huynh et al., 2002). Inoltre è stato visto che i livelli di proteina sono ridotti nell'ischemia cerebrale e questo spiega la risultante disfunzione del reticolo endoplasmatico e aggragazione proteica. E' stato suggerito anche che la parkina potrebbe giocare un ruolo protettivo nella morte cellulare per apoptosi ritardando il rigonfiamento

mitocondriale e riducendo il rilascio di citocromo c (Greene et al., 2003). Nelle condizioni in cui le mutazioni della parkina ne riducono l'attività catalitica, l'aumento dei suoi livelli bloccandone la sua degradazione (con l'inibizione del corrispondente enzima E2) è in grado di aumentare la perdita di substrati parkina-mediati e prevenire la degenerazione di neuroni dopaminergici. E' importante la scoperta di nuovi substrati della parkina associati con PD in quanto potrebbe servire alla scoperta di nuovi target molecolari per il trattamento della malattia di parkinson e per lo studio dei meccanismi di patogenesi.

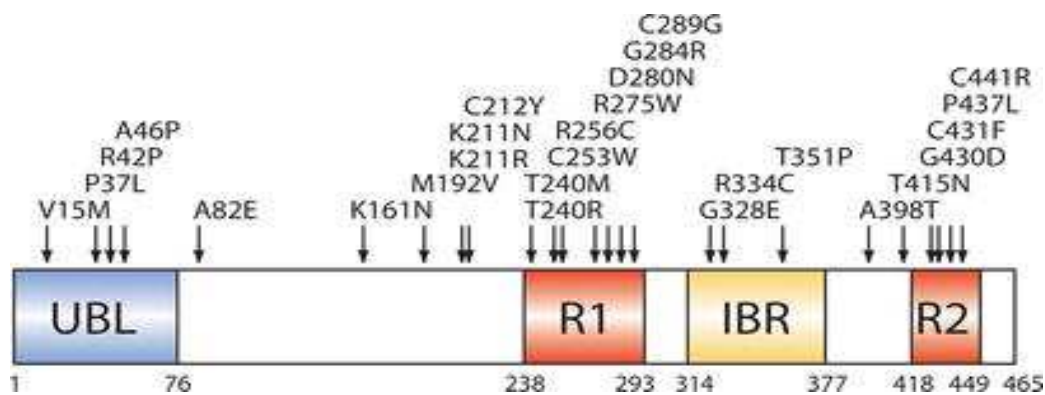


Figura C – *Struttura funzionale della parkina e principali mutazioni.*

2.3 Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e la parkina come enzima E3

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) si ritiene sia un importante meccanismo di fine regolazione e rapida degradazione responsabile del controllo di circa il 30 % delle proteine di nuova sintesi presenti nella cellula (Schubert et al., 2000). L'ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi prodotta da alcuni precursori proteici codificati nel genoma umano. Viene covalentemente attaccata a residui di lisina delle proteine substrato in un processo chiamato ubiquitinazione. Questo processo gioca un ruolo cruciale in diversi eventi cellulari come il ciclo cellulare, la trasduzione del segnale, il metabolismo e la risposta immunitaria (Pagano, 1997; Ben-Neriah, 2002). La poly-ubiquitinazione dei substrati è l'evento scatenante per la degradazione mediata dal proteasoma (Hershko and Ciechanover, 1998). L'ubiquitinazione delle proteine è mediata da tre diversi sistemi

enzimatici, in questo processo si ritiene che l'enzima E1 Ub-attivante e dipendente da ATP sia in grado di formare un intermedio ubiquitinato ad alta energia. L'ubiquitina attivata viene così accettata attraverso un legame tioestere da un enzima Ub-coniugante E2 (UBC). A questo passaggio due sono le due possibili opzioni, che risultano entrambe nell'attacco dell'ubiquitina al substrato attraverso un legame covalente:

1. L'ubiquitina viene trasferita ad un enzima Ub-protein ligasi E3 che interviene nell'ubiquitinazione del suo substrato legato oppure
2. l'enzima E3 accetta entrambe i substrati e permette all'enzima E2 il trasferimento diretto dell'ubiquitina dall'enzima E2 al substrato.

Infine il fattore di elongazione della catena di ubiquitina, altrimenti conosciuto con E4, può catalizzare la multiubiquitinazione delle proteine legate ai complessi E2-E3.

Nelle cellule di mammifero si conosce un solo tipo di enzima E1, mentre ad oggi la famiglia di enzimi E2 consiste di oltre 20 membri (Pickart, 2001). Centinaia di enzimi E3 si pensa siano presenti consentendo selettività al singolo pathway di ubiquitinazione. La reazione di ubiquitinazione può terminare con l'attacco di una singola molecola di ubiquitina, in un processo chiamato mono-ubiquitinazione, o con l'attacco di una molecola di ubiquitina a diversi residui di lisina della proteina di destinazione (mono-ubiquitinazione multipla). La parkina funziona come enzima ubiquitin E3 protein ligasi. L'enzima E3 di solito conferisce specificità al substrato e agisce come supporto per facilitare la richiesta stechiometrica dell'attacco covalente di ubiquitina. L'E3 protein ligasi può anche promuovere l'attacco di molecole di ubiquitina a residui di lisina presenti nelle molecole già attaccate ad un substrato inclusi i residui 48 e 63 per formare una catena di molecole di ubiquitina. Una catena di minimo quattro lisine al residuo 48 agiscono come segnale per la degradazione da parte del proteasoma quindi una volta poly-ubiquitinate, le proteine sono riconosciute come substrato per la degradazione mediata dal proteasoma 26S. Il proteasoma 26S è un largo complesso multiproteico (2.5 Mda) che richiede ATP per la degradazione delle proteine (Voges et al., 1999). La mono-

ubiquitinazione e le catene legate al residuo 63 di lisina tendono invece a funzionare in un processo non degradativo. La parkina sembra agire sia nella monoubiquitinazione che nella poliubiquitinazione con legame sia alla lisina 48 che alla lisina 63. La monoubiquitinazione da parte della parkina potrebbe, sotto certe circostanze, essere coinvolta nel *turnover* dei recettori (Fallon et al., 2006). Il legame mediato dalla parkina alla lisina 48 è coinvolto nella degradazione delle proteine e quello mediato alla lisina 63 nell'inclusione delle proteine nelle vescicole. La funzione e il tipo di modificazione che la parkina media è probabilmente largamente definita dal contesto cellulare e dal sistema ubiquitario di proteine che la parkina usa come adiuvanti. Ubiquitinazioni purificate *in vitro* suggeriscono che la parkina media primariamente reazioni di monoubiquitinazione. Tuttavia l'aggiunta di un'ubiquitin ligasi chaperone-dipendente detta CHIP e dell'aiuto di fattori simili all'enzima E4 permettono alla parkina di poly-ubiquitinare. La parkina quindi è una E3 ligasi multifunzionale che ha la capacità di partecipare ad una varietà di reazioni di legame di ubiquitina e di funzioni cellulari.

3. PARKINA E MALATTIA DI PARKINSON

Le mutazioni nella parkina che causano la malattia spaziano da sostituzioni di singola base a piccole delezioni, mutazioni nel sito di splicing e delezioni che arrivano fino a centinaia di migliaia di nucleotidi (West et al., 2004). Il quadro generale è che il PD correlato alla parkina deriva da tali meccanismi, in modo tale che le mutazioni della parkina portano ad una perdita di funzione della stessa. I trascritti tronchi vengono destabilizzati per *nonsense-mediated decay* e in questo modo viene impedita l'espressione della proteina. Tuttavia c'è una piccola evidenza che la parkina tronca è espressa ugualmente nei tessuti dei pazienti con delezioni esoniche. Molte mutazioni missenso sembrano anche portare ad una perdita di funzione attraverso la diminuzione della sua attività catalitica, una errata ubiquitinazione e l'impedimento della degradazione da parte del proteasoma e/o destabilizzazione della parkina che porta ad insolubilità o rapida degradazione proteasomale della sua forma mutante (Hampe et al., 2006; Matsuda et al., 2006; Wang et al., 2005; Winklhofer et al., 2003). La parkina inoltre gioca un ruolo anche nel PD sporadico attraverso mutazioni comuni e mutazioni frequenti. In aggiunta viene

inattivata attraverso stress nitrosativo, stress dopaminergico e stress ossidativo che sono processi patologici chiave nel PD sporadico. In questo modo la perdita dell'attività E3 ligasica gioca un ruolo non solo nell'insorgenza dell' AR-JP, ma anche in quella del PD sporadico.

3.1.a Aggregazione proteica e neurodegenerazione

Molti disordini neurodegenerativi sia sporadici che ereditari sono caratterizzati dalla presenza di aggregati proteici insolubili. Questi aggregati sono essenzialmente composti di elevati livelli di proteine multi-ubiquitinate (Alves-Rodrigues et al., 1998). L'iniziale aggregazione proteica può condurre all'accumulo di questi aggregati attraverso il progressivo blocco della funzionalità del sistema ubiquitina-proteasoma, che è coinvolto nella degradazione delle proteine. Inoltre è stato visto come le subunità del proteasoma colocalizzano nei corpi di inclusione associati con diverse malattie neurodegenerative (Cummings et al., 1998). Il fatto che la parkina sia una E3 ubiquitin-protein ligasi, o parte di un sistema a più componenti con attività simile ad E3, può suggerire che le mutazioni nella proteina stessa portano all'accumulo di una seconda proteina, o di alcune proteine, che sono tossiche per le cellule del Sistema Nervoso. In alternativa le proteine substrato potrebbero non essere direttamente tossiche, ma potrebbero essere una parte di molte proteine la cui attività è regolata in larga parte dalla degradazione del proteasoma, come le proteine del ciclo cellulare (Herchko and Ciechanover; 1998). Tuttavia un'altra possibilità è che la perdita di funzione di parkina causa un impedimento generalizzato da parte delle cellule di rimuovere proteine tossiche o dalla forma errata, e in questo modo provocare tossicità in modo indiretto. Il legame dei geni responsabili del PD umano al *pathway* dell'ubiquitina non è la sola linea d'evidenza secondo cui la degradazione delle proteine è importante nel PD. I corpi di Lewy infatti, che vengono trovati nelle cellule dopaminergiche superstiti nel PD sporadico, risultano positivi nella colorazione con anticorpi anti-ubiquitina (Lennox et al., 1989). La funzione del proteasoma è diminuita nei tessuti estratti dalla substantia nigra di pazienti PD rispetto ai pazienti controllo (McNaught and Jenner, 2001). I neuroni catecolaminergici sono preferenzialmente sensibili all'effetto tossico dell'inibizione del proteasoma *in vitro* (Petrucci et al., 2002).

Tuttavia, è estremamente difficile determinare se l'alterata degradazione proteica è la causa della disfunzione e morte cellulare o se è un problema secondario che avviene come conseguenza di altri eventi patologici.

3.1.b Substrati della parkina

Un grosso numero di substrati della parkina sono stati identificati tra cui il primo ad essere individuato è stato CDCrel-1. Quest'ultimo appartiene alla famiglia di GTPasi chiamate septine ed è fortemente espresso nel sistema nervoso dove si associa con le vescicole sinaptiche (Zhang et al., 2000) ed è in grado di indurre neurodegenerazione. Tuttavia, c'è una limitata evidenza che CDCrel-1 si accumula in assenza di parkina e che questa ne modula i suoi livelli *in vivo*. Il recettore simile all'endotelina parkina-associato (Pael-R) è un altro substrato putativo della parkina. Esso è una proteina transmembrana accoppiata a proteine G con omologia al recettore dell'endotelina di tipo B (Imai et al., 2001). Pael-R è primariamente espresso negli oligodendrociti, ma è presente anche nei neuroni dopaminergici. L'overespressione di Pael-R induce la risposta allo stress da proteine non foldate in cellule in coltura e ne provoca insolubilità. La parkina attenua la formazione di Pael-R in forma insolubile e la conseguente tossicità presumibilmente attraverso un meccanismo dipendente dall'ubiquitinazione. L'overespressione neuronale di Pael-R umano in *Drosophila* causa degenerazione selettiva età dipendente dei neuroni dopaminergici supportando l'idea della specificità neurodegenerativa (Yang, et al 2003). Tuttavia evidenze limitate suggeriscono che la parkina è invece un nativo fattore fisiologico responsabile per la regolazione di Pael-R. La proteina interattore con alpha-synucleina, synphilina-1, interagisce con ed è ubiquitinata dalla parkina portando alla formazione di aggregati proteici quando overespressi con l'alpha-synucleina in colture cellulari (Chung et al., 2001). La parkina preferenzialmente media la formazione di catene di poly-ubiquitina legate alla lisina 63 sopra la synphilina-1. Studi recenti suggeriscono che l'ubiquitinazione lisina 63 mediata può partecipare alla degradazione delle inclusioni servendosi come segnale per cargo autofagico quando il sistema ubiquitina-proteasoma è disfunzionale. In questo modo la parkina gioca un ruolo specializzato nella formazione

delle inclusioni e nella segnalazione delle proteine per lo smaltimento autofagico qualora il sistema ubiquitina-proteasoma non sia funzionante.

Esperimenti di *yeast-two hybrid* seguiti da conferma con co-immunoprecipitazione ed ubiquitinazione *in vitro* identificano una varietà di altri substrati della parkina. È stato visto infatti come questa sia in grado di interagire con eterodimeri di α - β tubulina e microtubuli agendo da stabilizzatore della formazione microtubulare potenzialmente in modo ubiquitina-dipendente (Yang et al., 2005). In altri studi, è stato visto come la parkina interagisce con la ciclina E nel contesto di un complesso proteico che include hScl-10 e la Cullina-1 ed è in grado di prevenire l'accumulo di ciclina E in neuroni trattati con il kainato (Staropoli et al., 2003). La parkina si lega anche alla proteina RanBP2 in modelli cellulari di overespressione e apparentemente influenza l'abilità a valle di RanBP2 esogeno di sumoilare altre proteine grazie all'ubiquitinazione attraverso la parkina.

Un numero di altre funzioni è stato attribuito alla parkina, come monoubiquitinare HSP70 anche se l'importanza di questa modificazione non è nota (Moore et al., 2008); ridurre la tossicità dell'atassina-2 e ubiquitinare l'atassina-2 mutante. Inoltre sarebbe in grado di partecipare al *trafficking* del recettore EGF e al funzionamento della chinasi PI(3) attraverso l'interazione con la proteina Eps15.

L'estremo c-terminale della parkina contiene un motivo di legame PDZ di classe II (-FDV) cosa che fornisce supporto all'idea che le proteine con domini PDZ (PSD-95/discs large/ZO-1) vi possano interagire.

Parkina e CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) colocalizzano in colture di neuroni corticali e a livello della densità post sinaptica e nei *lipid rafts* a livello cerebrale (Fallon et al., 2002). CASK è l'omologo in mammifero della proteina Lin2 in *Caenorhabditis elegans* ed è una guanilato chinasi associata a membrana (MAGUK) che contiene molti motivi che mediano l'interazione proteina-proteina. Studi di co-immunoprecipitazione usando tessuti da cervello di ratto hanno mostrato un'interazione indiretta della parkina anche con la proteina PDZ PSD-95, con la subunità del recettore NMDA NR2B, con la proteina chinasi II calcio/calmodulina dipendente e con la proteina sinaptica Homer 1 ma non con le proteine PDZ MUPP1 o con la neurabina. Diverse

proteine PDZ, per esempio le proteine che interagiscono con i recettori del glutammato PICK1, GRIP e la sintenina agiscono come proteina scheletro che ha il potenziale di mantenere le proteine che vi interagiscono in stretta vicinanza tra di loro (Hirbec et al., 2002). Dato il suo motivo di interazione PDZ, il legame della parkina con altre proteine PDZ o con la stessa CASK la lega indirettamente ad altre proteine e la mantiene in prossimità dei suoi substrati molecolari. La parkina infatti non è in grado di ubiquitinare CASK e questo suggerisce che CASK possa essere coinvolta nei movimenti della parkina a livello intracellulare. In che modo la perdita dell'interazione con CASK risulta nell'accumulo di parkina in anomali siti a livello neuronale e/o previene il legame della parkina con i suoi substrati non è ancora chiaro. E' importante come la mancanza selettiva degli ultimi 12 residui della parkina (che includono il motivo PDZ, -FDV) è stata legata a PD suggerendo come l'interazione CASK-parkina e la distribuzione di parkina nel neurone possono essere funzionalmente importanti. Studi di blocco dell'interazione CASK-parkina in neuroni o nell'animale non sono ancora stati effettuati anche se l'uso di peptidi o di composti a piccolo peso molecolare (Daw et al., 2000) possono mostrare un'alterazione nella distribuzione della parkina e/o delle sue proteine interattive nei neuroni e potrebbero fornire un nuovo modello animale per PD. La modulazione delle interazioni tra i motivi PDZ e i domini PDZ forniscono potenzialmente un nuovo approccio per lo sviluppo di una nuova classe terapie del PD e di altri disordini neurodegenerativi.

La proteina PSD-95/Discs-large/Zona Occludens-1 (PDZ) PICK1 è stata identificata come nuovo substrato della parkina (Joch et al., 2007). La parkina lega PICK1 attraverso un'interazione PDZ-mediata, che promuove la monoubiquitinazione di PICK1 piuttosto che la sua poly-ubiquitinazione. Consistente con la monoubiquitinazione ed i recenti lavori che vedono la parkina implicata in *pathways* proteasoma-indipendenti, la parkina non promuove la degradazione di PICK1. Tuttavia è in grado di regolare l'effetto di PICK1 su uno dei suoi altri compagni PDZ, il canale ionico acido sensibile (ASIC). L'overespressione della parkina *wild-type*, ma non quella della parkina difettiva per il legame PDZ o dell'attività E3 ubiquitin-ligasica, abolisce il potenziamento PICK1 dipendente delle correnti ASIC2a in cellule non-neuronali indotto da proteina chinasi C.

Contrariamente la perdita di parkina in neuroni ippocampali murini smascherano il prominente potenziamento delle native correnti ASIC che sono normalmente sopresse dalla parkina endogena in neuroni *wild-type*. I canali ASIC a livello centrale sono coinvolti nella plasticità sinaptica (Wemmie et al., 2002) e mediano una significativa componente di eccitotossicità calcio dipendente dopo insulto ischemico (Xiong et al., 2004). Così la parkina endogena copre il potenziamento dei canali ASIC PICK-1 dipendente in neuroni ippocampali suggerendo come potrebbe anche normalmente proteggere i neuroni da una attività eccessiva dei canali che porta ad eccitotossicità. Dato che i canali ASIC sono stati implicati nell'insulto dei neuroni dopaminergici (Pidoplichko and Dani, 2006), l'incontrollato potenziamento della corrente ASIC nei neuroni privi di parkina possono riflettere un'aumentata vulnerabilità di questi neuroni agli insulti in pazienti con mutazioni della parkina PD-associate. Altri interattorie substrati putativi sono stati identificati anche se in molti casi il loro ruolo nel PD mediato dalla parkina non è ancora stato definito.

3.2 Parkina e neuroprotezione

La parkina agisce come agente protettivo quando overespressa in diverse condizioni di stress. L'overespressione della parkina previene il rigonfiamento mitocondriale in cellule PC-12 trattate con ceramide o soggette a deprivazione di siero (Darios et al., 2003). L'eccitotossicità derivata da kainato viene attenuata dall'overespressione della parkina in cellule neuronali (Staropoli et al., 2003). La morte cellulare indotta da manganese viene ridotta dall'overespressione di parkina e quest'ultima protegge contro la tossicità dopaminergica (Jiang et al., 2004). L'esatto meccanismo attraverso il quale l'overespressione protegge contro una varietà di insulti tossici non è nota, ma sembra essere dipendente dalla sua attività E3 ligasica. La morte cellulare dovuta a dopamina è comparabile in topi privi di parkina rispetto a topi wild-type intossicati con MPTP o con 6-OHDA (Perez et al., 2005; Thomas et al., 2007). Inoltre l'espressione della parkina può

fornire una protezione non fisiologica ad una varietà di agenti stressanti ma i livelli endogeni di parkina non partecipano nella sopravvivenza neuronale a questi vari stressanti. La tossicità dell' α -synucleina in ratto, *Drosophila* e modelli cellulari viene ridotta dall'overespressione di parkina, tuttavia la parkina e α -synucleina non interagiscono e non sono in grado di legarsi l'una all'altra in diversi studi funzionali (Chung et al., 2001), un solo lavoro propone come condizione per l'interazione modificazioni post-traduzionali ma questo non è stato mai riconfermato (Shimura et al., 2000). Tuttavia il modo in cui l'overespressione della parkina previene la tossicità dovuta all' α -synucleina non è chiaro e come per gli agenti stressanti esterni, la parkina potrebbe proteggere la tossicità dovuta ad α -synucleina in maniera non specifica. La tossicità e il fenotipo associato con α -synucleina mutante non sono influenzati dalla perdita di parkina in un incrocio tra topi privi di parkina e topi overesprimenti α -synucleina. Evidenze biochimiche suggeriscono che la perdita di espressione di parkina influenza la tossicità dovuta ad α -synucleina in studi che usano il contesto inverso di overespressione sia di parkina che di α -synucleina. L'implicazione è che la parkina potrebbe acquisire nuovi, quanto non specifici, attributi quando viene espressa in concentrazioni non fisiologiche. Studi addizionali riguardanti la parkina endogena sono richiesti per capire il suo ruolo non definito nella protezione contro una varietà di stressanti inclusa l' α -synucleina. Più importante è porgere l'attenzione su come la parkina endogena funziona e regola la sopravvivenza dei neuroni dopaminergici. I diversi studi sui substrati della parkina e sulle sue proprietà neuroprotettive hanno supportato il consenso nel campo della funzione fisiologica della parkina e nel suo ruolo patologico nel PD. La maggioranza dei substrati sono conosciuti solo da un numero limitato di esperimenti che, in generale, non riescono a determinare gli effetti di ubiquitinazione sulla funzione di queste proteine e qualora l'interazione abbia rilevanza fisiologica. Nel modello murino privo di parkina non è stato dimostrato l'aumento significativo di una particolare proteina in studi di proteomica. E' difficile ritrovare un comune *pathway* biochimico tra i substrati che interagiscono e non ci sono dati genetici o biochimici che possono elevare un particolare substrato ad una condizione più importante con la possibile eccezione di AIMP2 e FBP-1 che si accumulano in modelli *in vivo* di disfunzioni di parkina.

3.3 Parkina e funzione mitocondriale

Indicazioni sul ruolo della parkina come determinante della patologia deriva da recenti studi in *Drosophila*. L'assenza di parkina in *Drosophila* porta a patologia mitocondriale e a degenerazione per apoptosi del muscolo e aumenta la possibilità che un simile blocco mitocondriale possa far partire la selettiva perdita cellulare osservata nell'AR-JP (Greene et al., 2003). A dispetto dei lievi deficit, i topi privi di parkina presentano disfunzioni mitocondriali e danno ossidativo e gli stessi pazienti presentano una diminuita attività del complesso I mitocondriale a livello dei linfociti (Muftuoglu et al., 2004) fornendo ulteriori prove a sostegno del fatto che la mancanza di parkina è in grado di provocare deficit mitocondriale. In che modo la parkina possa regolare la funzione mitocondriale non è noto. Una piccola frazione della parkina risiede negli stessi mitocondri o nelle loro vicinanze, suggerendo che la parkina può regolare una proteina mitocondriale che è importante per la funzionalità di questi organelli. Tuttavia la possibilità per gli anticorpi anti-parkina di detectare la proteina endogena ha reso la questione sulla sua localizzazione mitocondriale più interessante (Pawlyk., et al 2003). La parkina sembra anche aumentare la biogenesi mitocondriale attraverso un meccanismo ancora non riconfermato (Kuroda et al., 2006). Altre indicazioni provengono da ulteriori studi in *Drosophila*. La perdita di PINK1 in *Drosophila* porta anch'essa a deficit nella funzionalità mitocondriale che risulta in sterilità maschile, degenerazione del muscolo per apoptosi e perdita dei neuroni dopaminergici che rispecchiano il fenotipo provocato dalla perdita di parkina (Park et al., 2006). Il fenotipo provocato dalla perdita di funzione di PINK1 viene revertito dall'overespressione di parkina, ma il fenotipo provocato dalla perdita di funzione della parkina non è revertito da PINK1 suggerendo che PINK1 e la parkina, almeno in parte, agiscono nello stesso *pathway* e che PINK1 funziona a monte (Tan et al., 2006). E' plausibile che la parkina regola il livello basale di una proteina critica per il mantenimento della funzionalità mitocondriale. Questo putativo substrato della parkina dovrebbe accumularsi in modelli di inattivazione della proteina stessa come modelli di parkina knockout o di intossicazione da MPTP, AR-JP dovuto a mutazioni di parkina e in PD sporadico. Tuttavia PINK1 potrebbe regolarne l' interazione o ubiquitinazione da

parte della parkina, studi futuri saranno necessari per identificare il legame mancante tra le due proteine.

3.4 La parkina nella plasticità sinaptica

La risposta crescente al neurotrasmettitore eccitatorio glutammato e l'associata eccitotossicità è stata implicata nella patogenesi del PD (Dawson and Dawson, 2003); Beal, 1998; Rodriguez et al., 1998). Tuttavia, il meccanismo molecolare che lega i fattori di rischio per PD all'alterata eccitabilità e vulnerabilità eccitotossica resta sconosciuto. Tra i substrati della parkina diverse proteine sono implicate nella trasmissione sinaptica, incluse CDCrel-1, α -synucleina glicosilata, synphilina, synaptotagmina XI, Eps 15 e PICK1. La parkina si associa con le proteine scaffold PDZ nella densità post-sinaptica (PSD) (Fallon et al., 2002) e protegge i neuroni post-mitotici dall'eccitotossicità mediata dai recettori del glutammato (Staropoli et al., 2003; Moszczynska et al., 2007), suggerendo un legame tra la parkina e la funzionalità sinaptica. Consistente con queste premesse, i topi privi di parkina mostrano sia deficit motori che cognitivi e alterata eccitabilità nell'ippocampo e nello striato (Goldberg et al., 2003; Itier et al., 2003). Un recente lavoro ha quindi dimostrato come l'ubiquitin-ligasi parkina è in grado di regolare la forza e l'abbondanza della sinapsi eccitatoria (Helton et al., 2008). Quando la parkina è espressa a livello post sinaptico, la trasmissione eccitatoria sinaptica è smorzata e il segnale glutamatergico è significativamente ridotto. A questo proposito, la parkina agisce come limitante dell'input sinaptico eccitatorio. Questa diminuzione nella trasmissione sinaptica non avviene nel caso in cui vengono utilizzati dei mutanti di parkina legati a malattia o in seguito a perdita di parkina endogena. Raffinando o contenendo i circuiti sinaptici, la riduzione delle sinapsi glutamatergiche da parte della parkina fornisce un meccanismo per controllare l'eccitazione. La riduzione delle sinapsi eccitatorie potrebbe essere quindi un fenomeno di sviluppo o potrebbe riflettere una più fine regolazione che continua durante la vita adulta visto che la parkina è espressa precocemente nello sviluppo cerebrale e la sua espressione viene mantenuta durante la vita adulta (Wang et al., 2001).

SCOPO DEL LAVORO

Mutazioni nel gene PARK2 causano la più comune forma recessiva di malattia di Parkinson (PD). Il prodotto del gene PARK2, chiamato *parkina*, è una E3 ubiquitin-ligasi che interviene nel processo di ubiquitinazione di diverse proteine.

Diverse mutazioni nel gene PARK2 vengono associate alla malattia comprese sostituzioni di singola base, delezioni o sostituzioni di poche paia di basi fino alla delezione di interi esoni. La presenza di mutazioni in omozigosi o in eterozigosi composta necessarie allo sviluppo della malattia suggeriscono come meccanismo patogenetico una perdita di funzione della proteina stessa (West et al., 2004).

Tuttavia nonostante l'identificazione del gene malattia (Kitada et al., 1998) rimane tutt'ora sconosciuta la ragione per cui una mutazione è in grado di provocare la progressiva morte dei neuroni dopaminergici.

Crescenti evidenze indicano come causa di perdita neuronale il danno eccitotossico. I neuroni del Sistema Nervoso Centrale (SNC) sono altamente esposti alla stimolazione glutamatergica, così che il neurotrasmettitore eccitatorio glutammato è in grado di agire sia come neurotossina che come neurotrasmettitore, candidandosi come fattore centrale nella patogenesi del PD (Dawson et al., 2003; Beal et al., 1998; Rodriguez et al., 1998).

E' noto come i neuroni della *substantia nigra pars compacta* (SNpc) ricevono segnali glutamatergici da diverse aree del SN compresi la corteccia, il nucleo peduncolopontino (Lavoie and Parent, 1994), il collicolo superiore (Comoli et al., 2003), il talamo e il nucleo subtalamico (STN). Inoltre il STN presenta nel PD una continua attività anomala derivante dalla mancanza di dopamina (Lozano et al., 2002) con conseguente rilascio eccessivo di glutammato nel SNC (Rodriguez et al., 1998). In questo contesto è stato suggerito che le mutazioni genetiche associate a PD possono aumentare il rischio di sviluppo di PD rendendo i neuroni dopaminergici più vulnerabili alle concentrazioni fisiologiche di glutammato.

Nel caso delle mutazioni PARK2, è stato visto che la parkina è in grado di legarsi a proteine della densità post sinaptica (Fallon et al., 2002) e di proteggere i neuroni post mitotici dall'eccitotossicità mediata dai recettori del glutammato (Staropoli et al., 2003; Moszczyńska et al., 2007).

Infine un recente studio ha dimostrato come la parkina sia in grado di regolare la funzionalità e la stabilità delle sinapsi eccitatorie aumentandone la vulnerabilità agli stimoli eccitotossici in caso di mutazioni (Helton et al., 2008), fornendo in questo modo prove a sostegno del possibile legame tra parkina e funzionalità sinaptica.

Date queste premesse è stato pensato che la perdita di funzione della parkina possa avere un ruolo nella maggiore suscettibilità dei neuroni dopaminergici alla stimolazione da glutammato. A tale proposito è stato pensato di studiare la risposta glutamatergica in un modello neuronale privo di parkina, in modo da mimare i possibili effetti dello stimolo tossico a livello molecolare e in modo da comprendere quale subunità recettoriale glutamatergica subisca variazioni specifiche in seguito a perdita di funzione della parkina sia a livello strutturale che funzionale.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Cellule umane SH-SY5Y (ATCC-LGC) sono state cresciute e propagate in RPMI contenente 10% siero fetale bovino deplementato (Gibco BRL, Invitrogen), 50 I/mL penicillina e 50 Ig/mL streptomicina (Invitrogen). Il modello di PD “*in vitro*” è stato ottenuto trasfettando stabilmente le cellule SH-SY5Y con il plasmide codificante per shRNA selettivo per la parkina umana. Tre diversi shRNA sono stati disegnati e sono stati ottenuti i corrispondenti modelli cellulari identificati come cellule sh parkin. Le sequenze dei primer sono:

sh-591 5' GTACAGTGCAGCACCTGCAGGCAGG 3'

sh-183 5' ATCAGCAGAGCATTGTTTCACGAATGAACAATGCTCTGCTGATCC 3'

sh-229 5' TCAAGAAATGAATGCAACTCGAAAGTTGCATTCATTTCTTGACC 3'

Come controllo negativo è stato usato un plasmide codificante un shRNA per l'mRNA del LacZ batterico. Le cellule sono state piastrate su piastre a sei pozzetti e cresciute fino al 60-80% di confluenza. Le cellule sono state transfettate usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Le cellule transfettate sono state mantenute in selezione per quattro-sei settimane con G418 0.2 mg/mL fino alla selezione dei cloni resistenti. In seguito diversi cloni per ogni shRNA sono stati raccolti insieme per evitare la selezione di singoli cloni che potevano portare aberrazioni cromosomiche. L'integrazione stabile del plasmide esogeno nel DNA genomico delle cellule SH-SY5Y è stata verificata attraverso PCR con primer in grado di amplificare selettivamente il vettore pDEST.

Sostanze chimiche utilizzate

Terreno RPMI, siero fetale di vitello inattivato al calore e penicilina/streptomicina sono stati acquistati dalla Gibco BRL e dall' Invitrogen (Grand Island, NY). CNQX, NS-102, IEM1460, Ciclotiazide, Concanavalina A e Glutammato sono stati acquistati dalla SIGMA (St.Louis, MO). Fluo4NW kit dalla Molecular Probes e tutte le altre sostanze, se non diversamente indicate, sono state acquistate dalla Sigma (St.Louis, MO).

Vitalità Cellulare

Per valutare l'effetto del glutammato sulle cellule prive di parkina e sulle cellule controllo, è stata misurata la vitalità cellulare attraverso conta cellulare con Coulter Counter e saggio MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]. Per la conta cellulare con Coulter Counter, le cellule sono state piastrate in piastre da sei pozzetti ad una densità di 300,000/pozzetto in tre piastre. Dopo il trattamento e ai tempi indicati, le cellule sono state staccate mediante tripsina e raccolte in 10 ml di soluzione isotonica e contate in triplicato usando una macchina Coulter Counter (Z2 Coulter Counter, Beckman-Coulter, Fullerton CA). Per il saggio MTS, sono state piastrate 10,000 cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti, lasciate in coltura per 24 ore in modo da permetterne l'adesione, incubate con le varie sostanze e analizzate a 48, 72 e 120 ore con saggio di proliferazione cellulare Cell Titer 96A_{Queous} (Promega, Southampton, UK).

Misura del $[Ca^{2+}]_c$

Le cellule sono state registrate 24 ore dopo la piastratura. Il Ca^{2+} intracellulare è stato monitorato con l'indicatore ad alta affinità per il Ca^{2+} Fluo4NW ($EC_{50} = 22.6$ nM) utilizzando la microfluorimetria.

Le cellule sono state incubate a 37°C per 60 minuti con Fluo4NW secondo il protocollo indicato dal produttore. I dati presentati sono stati ottenuti con un emissione di fluorescenza a 530 nm.

Western blotting

Le cellule di neuroblastoma sono state raccolte in PBS freddo dopo centrifugazione, sono state lisate in ghiaccio per 15 minuti in baffle contenente 20 mM TRIS pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 e inibitore delle proteasi (Roche). I lisati sono stati brevemente sonicati e la concentrazione proteica è stata determinata usando il reagente Bio-Rad Protein-Assay-Reagent (Bio-Rad Laboratory) e BSA (Albumin from bovine serum) come standard. Gli omogenati sono stati diluiti con 3X SDS sample buffer (180 mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 30% glycerol, 300 mM DTT and 0.02% blue di bromofenolo).

Le proteine sono state separate su gel di poliacrilammide al 7.5%. La corsa del gel avviene in Running buffer 1x (H₂O deionizzata, 20 mM Glicina, 250 mM Tris, 1% SDS). Al gel viene applicato un campo elettrico costante di 50 Volt fino al termine della corsa.

COMPOSIZIONE DEL GEL (7.5%):

RUNNING	1 gel	2 gel
H₂O	2.9 ml	5.8 ml
Running Buffer 4X	1.5 ml	3 ml
Acrilamide	1.6 ml	3.2 ml
APS (10 %)	25 µl	50 µl
Temed	2.5 µl	5 µl

STACKING	1 gel	2 gel
H₂O	1.35ml	2.7 ml
Running Buffer 4X	0.56 ml	1.125 ml
Acrilamide	0.3 ml	0.6 ml
APS (10 %)	18.75 µl	37.5 µl
Temed	1.87 µl	3.75µl

I campioni sono trasferiti elettroforeticamente dal gel di poliacrilamide ad una membrana di nitrocellulosa in un tampone di Blotting 1x (Trizma Base 20mM, Glicina 150mM, 20% metanolo, 0.01% SDS, pH8.3) a 240 mA per 120 minuti.

Dopo il trasferimento le proteine sono state visualizzate con Red Ponceau 1x. Dopo rimozione dell'eccesso di colorante i filtri di nitrocellulosa sono stati saturati in *blocking buffer* (0.1% Tween 20, Tris 20mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, latte in polvere al 5%) per circa un'ora.

I fogli di nitrocellulosa sono stati incubati a temperatura ambiente per 3 ore, in agitazione, con un anticorpo primario.

Gli anticorpi primari utilizzati e le relative diluizioni sono:

Gli anticorpi vengono diluiti in tampone TBS-Tween (0.1% Tween 20, Tris 20mM, NaCl 150 mM, pH 7.5)/latte in polvere al 3%. Dopo tre lavaggi in TBS-Tween i complessi antigene-anticorpo sono stati rilevati con anticorpi secondari anti IgG di coniglio e topo (AMERSHAM), coniugati con perossidasi, diluiti 1:1000 in tampone TBS-Tween 1%/latte al 3%.

Alla fine del periodo di incubazione con gli anticorpi secondari (1 ora) i filtri sono stati lavati 3 volte in TBS Tween e visualizzati mediante reazione con Enhanced ChemiLuminescence (Ge-healthcare, Piscataway, NJ).. Le relative immagini sono state ottenute mediante sviluppo con lastre fotografiche e sviluppatrice (Kodak).

I pesi molecolari delle proteine sono stati calcolati in base alla migrazione elettroforetica di pesi molecolari standard (SIGMA).

Gli anticorpi primari utilizzati e le relative diluizioni sono:

- anticorpo policlonale anti GRIK2 (GluR6) (ab28697 prodotto in coniglio, abCam 1:400)
- anticorpo policlonale anti GRIK2 (GluR6) (HPA014623 prodotto in coniglio, SIGMA 1:1,000)
- anticorpo monoclonale anti Gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) (prodotto in coniglio, Biogenesis 1:20,000)

- anticorpo monoclonale anti Parkin, clone PRK8 (prodotto in topo, SIGMA 1:5,000)

Co-immunoprecipitazione

Le cellule sono state lisate in un tampone contenente 20 mM TRIS pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 e inibitori delle proteasi (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany). Gli estratti proteici sono stati centrifugati a 14,000 X g per 30 minuti in modo da eliminare i detriti cellulari. Un passaggio di pre-clearing è stato effettuato incubando 1 ml di ciascun estratto alla concentrazione di 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con 100 μl di proteina A/G-sepharoso/Tris-buffered saline slurry (Ge-Healthcare) per 1 ora a 4 °C. Gli estratti proteici sono stati quindi incubati con 2 μg di anticorpo anti parkina a 4 °C per tutta la notte. La soluzione è stata quindi incubata con 50 μl di di proteina A/G-sepharoso/Tris-buffered saline slurry per 1 ora a 4 °C, le palline vengono così lavate per tre volte con tampone di lisi e le proteine legate vengono eluite in seguito a bollitura per 10 minuti in sample buffer. I campioni sono stati analizzati tramite Western Blot.

Elettrofisiologia

Le registrazioni di patch-clamp sono state effettuate in configurazione di whole-cell, derivando così la corrente totale sviluppata in risposta al glutammato (6mM per 2-6 secondi).

La perfusione di una soluzione di controllo, di brevi impulsi di glutammato e del bloccante del recettore kainato (NS-102, 150 μM) è stata ottenuta utilizzando una pipetta multiviva (BioLogic).

Soluzione extracellulare (mM): NaCl 145, KCl 5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, HEPES 10, glucose 10 (pH 7.35).

Soluzione intrapipetta (mM): KCl 124, NaCl 4, CaCl₂ 0.02, MgCl₂ 2, EGTA 0.8, ATP-Mg 3, GTP-Na 0.1, glucose 10, HEPES 10 (pH 7.2).

PCR quantitativa (Real Time)

L' RNA totale da colture cellulari è stato estratto usando TRIzol (Invitrogen) secondo il protocollo indicato dal produttore. Tutto l'RNA estratto (1mg) è stato retrotrascritto usando SuperScript II (Invitrogen). Una reazione di PCR quantitativa è stata usata per quantizzare gli RNA messaggeri (mRNA) di GluR 5, 6, 7. Per ogni campione, 10 ng di stampo è stato amplificato in duplicato in una reazione di PCR su una macchina ABI PRISM 7700 usando un saggio Assay-on-Demand Gene Expression Products (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gli mRNA delle subunità KAR e il gene normalizzatore (Actina) sono stati marcati con FAM. I dati sono stati analizzati con un software SDS 2.1. La relativa quantità di ciascun mRNA è stata normalizzata con la relativa quantità del trascritto di Actina nello stesso cDNA e i dati sono stati espressi come $2^{-\Delta CT}$.

Transfezione cellulare

Cellule HEK293T sono state transfettate utilizzando Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen), secondo il protocollo indicato dal produttore. Il plasmide codificante la parkina umana è stato generato attraverso l'inserzione nel frame di lettura di un frammento di DNA amplificato per PCR codificante la parkina umana nel vettore pcDNA4-Myc-HIS (Invitrogen, CA).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc., Chicago, IL). I dati sono presentati come media \pm SEM. La significatività statistica è stata determinata comparando la media di diversi gruppi usando il t test o l'ANOVA seguita dal Post Hoc Tukey test.

RISULTATI

E' stato visto come mutazioni nel gene PARK2 causano una forma recessiva ereditaria di PD (Kitada et al., 1998). Tale gene codifica per una proteina E3 ubiquitin ligasi chiamata parkina la cui perdita di funzione in seguito a mutazioni è causa dell' insorgenza di malattia. Tuttavia nonostante i recenti progressi nel definire le proprietà molecolari e i diversi substrati della parkina, poco è ancora conosciuto sul suo ruolo funzionale e sui meccanismi patogenetici che sono alla base della patologia.

Inoltre tra i vari ruoli che la parkina sembra assumere a livello cellulare e che potrebbero prendere parte nei meccanismi di malattia, tra cui neuroprotezione (Darios et al., 2003) e funzionalità mitocondriale (Muftuoglu et al., 2004; Kuroda et al., 2006), l'ipotesi più recente sembra suggerire per la parkina un ruolo di protezione tossicità mediata dal glutammato grazie alla sua partecipazione nei meccanismi di rimaneggiamento sinaptico (Helton et al., 2008).

A partire da queste considerazioni, e per capire in che modo la perdita di funzione della parkina possa contribuire ai meccanismi che stanno alla base del PD, abbiamo utilizzato una linea cellulare dopaminergica immortalizzata (SH-SY5Y) che esprime stabilmente un shRNA selettivo per la parkina umana. Abbiamo utilizzato cellule SH-SY5Y in modo da mimare il più possibile la condizione di perdita della parkina in un modello neuronale dopaminergico che chiameremo sh-parkin per distinguerle dalla linea cellulare parentale. Sono stati utilizzati tre diversi shRNA in modo da ottenere tre diverse linee stabili tutte silenziate per la parkina ed ottimizzare in questo modo la percentuale di silenziamento. Inoltre come linea cellulare di controllo, in modo da evitare che gli effetti ottenuti siano causati dall'azione aspecifica dell' shRNA, è stata utilizzata una linea cellulare SHSY5Y silenziata per un gene non presente nell' uomo che è il gene LacZ, che chiameremo shLacZ. Prima di procedere con la creazione di un modello cellulare neuronale stabile SHSY5Y, l'efficacia di *interference* delle sequenze scelte per l'shRNA è stata valutata mediante espressione transiente in cellule SHSY5Y, tramite real-time PCR e western blot per l' mRNA e la proteina parkina. L'espressione di questi shRNA contro il messaggero della parkina provoca una notevole riduzione dei livelli di parkina endogeni (FIG.1).

L'obiettivo che ci si poneva era quello di valutare innanzitutto la risposta di queste cellule ad uno stimolo eccitatorio glutamatergico in modo da valutare la possibile diversa vulnerabilità delle cellule prive di parkina rispetto alle cellule controllo.

Il calcio intracellulare è stato monitorato con l'indicatore ad alta affinità Fluo4NW ($EC_{50} = 22.6 \text{ nM}$) misurando, attraverso microfluorimetria, l'emissione di fluorescenza a 530 nm. Misure quantitative della concentrazione di calcio monitorato ad intervalli di 2 secondi, rivelano che la stimolazione con Glutammato (1-6 mM) provoca picchi della concentrazione citoplasmatica di calcio $[Ca^{2+}]_c$ dose dipendenti rapidi e transienti nelle cellule sh-parkin rispetto ad un aumento impercettibile nelle cellule controllo (FIG.2A-C).

Per indagare qualora questo particolare influsso di Calcio sia conseguenza di un entrata di Calcio extracellulare o di un rilascio dalle riserve intracellulari, gli esperimenti precedenti sono stati replicati aggiungendo al tampone extracellulare un chelante degli ioni Calcio (Ca^{2+}) chiamato EGTA. Si è così osservato che in seguito all'aggiunta di EGTA i picchi progressivamente diminuivano in modo dose dipendente indicando che l'aumento del $[Ca^{2+}]_c$ viene sostenuto o comunque inizializzato da un influsso di Calcio extracellulare (FIG.2D).

Tutte e tre i gruppi di recettori ionotropici del Glutammato possono permettere un rapido influsso di Ca^{2+} in seguito a stimolazione glutamatergica (Dingledine et al., 1999). Nel tentativo di individuare quale dei tre gruppi recettoriali fosse responsabile della massiva entrata di ioni Calcio in seguito a stimolazione glutamatergica, la misurazione del $[Ca^{2+}]_c$ è stata effettuata in presenza di differenti concentrazioni di antagonisti selettivi per il gruppo NMDA, per il gruppo AMPA e per quello KAINATO (KAR). L'applicazione del D-AP5 (250-500 μM), un antagonista competitivo del recettore NMDA (Watkins et al., 1990), non è in grado di antagonizzare l'effetto del Glutammato (FIG.3A). Al contrario il CNQX, che è un antagonista competitivo sia del gruppo recettoriale AMPA che di quello KAR (Sheardown et al., 1993), a concentrazioni che vanno da 50 a 200 μM , è in grado di diminuire significativamente gli effetti del Glutammato in modo dose dipendente (FIG.3B).

A questo punto è stato utile utilizzare antagonisti specifici per il gruppo AMPA o per il gruppo KAR per capire quale dei due gruppi, o se entrambi, era il responsabile della diversa risposta al Glutammato osservata nelle sh-parkin rispetto alle cellule controllo.

Si è così osservato che l'antagonista NS-102 per il gruppo dei recettori del Kainato (Johansen et al., 1993; Verdoorn et al., 1994), a concentrazioni da 50 a 150 μM , è in grado di antagonizzare efficacemente l'effetto del Glutammato in maniera dose-dipendente (FIG.3D). Invece l'antagonista IEM-1460, selettivo per il gruppo AMPA (Schlesinger et al., 2005), utilizzato alle stesse concentrazioni dell' NS-102, non è in grado di inibire in modo efficace l'aumentata entrata di Ca^{2+} a livello citoplasmatico (FIG.3E).

Per confermare il coinvolgimento del gruppo recettoriale KAR nell'ingresso di Calcio nelle cellule sh-parkin, gli esperimenti di misura dei livelli di $[\text{Ca}^{2+}]_c$ sono stati ripetuti in presenza di Concanavalina A. La Concanavalina A è una lectina di derivazione naturale che è in grado di inibire selettivamente e irreversibilmente la desensitizzazione dei recettori del KAR (Wong et al., 1993).

L'applicazione di Glutammato, in presenza di Concanavalina A, rafforza i picchi di $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dando ulteriore conferma del presunto ruolo dei recettori KAR nell'anomalo aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nel modello sh-parkin rispetto al modello di controllo sh-LacZ in seguito a stimolazione glutamatergica (FIG.3F).

Ad ulteriore conferma che l'aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nel modello sh-parkin deriva dall'attivazione dei recettori KAR, è stata valutata la risposta elettrofisiologica di queste cellule alla perfusione mediante registrazione patch-clamp. La risposta media risultante dalle cellule sh-parkin e da quelle controllo (FIG.4) mostra come la corrente evocata dal glutammato risulti più alta nelle cellule sh-parkin se paragonata a quella evocata nelle cellule sh-LacZ ($p < 0.01$). Inoltre l'antagonista NS-102, selettivo per i recettori KAR, utilizzato nello stesso tipo di misurazioni è in grado di prevenire la corrente evocata dal glutammato nel modello cellulare privo di parkina.

Come riportato in letteratura, i recettori KAR sono soggetti a rapida desensitizzazione in risposta alla stimolazione con glutammato (Priel et al., 2006) e per tale ragione quando il modello cellulare sh-parkin viene trattato con Glutammato ad una concentrazione di 6

mM non mostra un elevato tasso di mortalità né questo viene visto nel modello cellulare di controllo sh-LacZ.

Quindi è stata valutata la vitalità cellulare con saggio MTS a 48-72 e 120 ore dopo trattamento con glutammato in presenza di Concanavalina A, che inibisce in modo irreversibile la desensitizzazione e quindi l'endocitosi del recettore.

Il saggio MTS è basato sulla capacità delle cellule vitali di metabolizzare, grazie alla succinato deidrogenasi mitocondriale, il sale giallo di tetrazolio⁷⁹(MTS), in presenza di fenazina metosulfonato (PMS) come accettore di elettroni, in formazano color porpora direttamente solubile nel mezzo di coltura. Tale capacità è stata misurata dall'assorbanza a 490 nm, che è proporzionale al numero di cellule vitali.

E' interessante notare come la presenza del glutammato insieme con la Concanavalina A siano in grado di indurre morte cellulare nelle cellule sh-parkin del 50-60 %, mentre nelle cellule controllo il co-trattamento non è in grado di indurre una morte cellulare significativa.

Ad ulteriore conferma del fatto che la tossicità da glutammato nelle cellule sh-parkin sia mediata dai recettori KAR piuttosto che dal gruppo di recettori AMPA o NMDA, il saggio di vitalità è stato effettuato in presenza di Ciclotiazide (CTZ). La Ciclotiazide che è uno specifico inibitore della desensitizzazione del gruppo di recettori AMPA (Yamada and Tang, 1993) è stato aggiunto alle cellule insieme al glutammato e al posto della Concanavalina, e a dimostrazione del fatto che la mancata desensitizzazione di questi recettori non è in grado di provocare tossicità, non vi è significativa morte cellulare né nelle cellule sh-parkin né nelle cellule controllo (FIG.5).

Quando il trattamento di glutammato e Concanavalina A viene effettuato in presenza di NS-102, che è un antagonista competitivo dei recettori KAR, si può vedere come il blocco selettivo di questi recettori è in grado di diminuire la tossicità e di migliorare la sopravvivenza delle cellule sh-parkin in modo dose-dipendente. Infatti la percentuale di morte cellulare diminuisce significativamente (dal 65% al 35%) in presenza di NS-102 ad una concentrazione di 100 μ M. Al contrario l'esperimento di vitalità cellulare effettuato in presenza di IEM-1460, l'antagonista per i recettori AMPA, non determina un miglioramento della vitalità e quindi non sembra svolgere nessun effetto protettivo

Questi dati rappresentano un'ulteriore prova a sostegno del supposto ruolo dei recettori KAR nell'anomala sensibilità al glutammato nelle cellule sh-parkin.

I recettori KAR sono tetrameri formati da canali composti da diverse subunità: GluR5, GluR6 e GluR7 formano recettori-canale omomerici attivati da Kainato e glutammato quando espressi in un sistema eterologo (Bettler et al., 1990; Egebjerg et al., 1991; Lomeli et al., 1992; Sommer et al., 1992) mentre KA1 e KA2 mostrano una certa affinità di legame al Kainato ma non sono in grado di formare canali recettoriali omomerici funzionali (Herb et al., 1992).

Quindi abbiamo analizzato i livelli delle diverse subunità sia per quanto riguarda l'espressione proteica che per quanto riguarda quello che c'è a monte e cioè l'espressione del loro RNA messaggero (mRNA). Per quanto riguarda i livelli di mRNA, analizzati tramite RT-PCR utilizzando Actina come normalizzatore, è possibile vedere come nella linea cellulare indifferenziata SH-SY5Y analizzata vengono espressi livelli significativi di GluR6, livelli bassi dell' mRNA di GluR7 e livelli impercettibili della subunità GluR5 (FIG.6A). Inoltre non vi è nessuna differenza statisticamente significativa nell'espressione del messaggero di GluR6 e di GluR7 tra le cellule sh-parkin e le cellule di controllo ($p > 0.05$).

Per quanto riguarda invece i livelli di proteina, l'analisi effettuata partendo da lisati totali sottoposti a Western Blot, con anticorpi specifici per le diverse subunità, mostra livelli quasi inesistenti di GluR5, appena visibili di GluR7 nella linea cellulare parentale SH-SY5Y e nelle due linee cellulari utilizzate nel nostro studio, paragonate ad un lisato totale estratto da encefalo di topo usato come controllo positivo (FIG.6B). A questo punto per valutare l'espressione di GluR6 nella linea cellulare di nostro interesse è stata effettuata un' analisi di Western Blot con un anticorpo specifico che ha rivelato la presenza di due specie immunoreattive maggiormente presenti, una a maggior peso molecolare che rappresenta la proteina intera (~ 116 kDa) e una banda a più basso peso molecolare (~ 45 kDa) che risultava visibile solo nelle cellule sh-parkin ed era assente sia nelle cellule parentali che nelle cellule di controllo (FIG.7A).

La banda a più basso peso molecolare, che supponiamo possa essere un frammento proteolitico ottenuto dalla proteina *full-length* è stata osservata in entrambi i cloni cellulari

ottenuti utilizzando due diversi shRNA per la parkina umana. E' stata inoltre eseguita l'analisi densitometrica con il programma Quantity-One dei livelli di proteina full-length, del frammento proteolitico e dei livelli totali di GluR6, che derivano dalla somma delle due diverse forme della proteina, in tutte le linee cellulari utilizzate: cellule parentali, sh-LacZ e sh-parkin. In grafico è possibile vedere come i livelli della forma *full-length* sono paragonabili nelle tre linee cellulari mentre il frammento proteolitico è presente a livelli significativi solo nella linea sh-parkin. I livelli totali di proteina, ottenuti sommando la forma *full-length* a quella proteolitica, risultano essere significativamente più elevati nella linea cellulare sh-parkin rispetto alla linea cellulare di controllo e a quella parentale (FIG.7B).

Questi dati suggeriscono una predominante presenza a livello cellulare della subunità GluR6 fornendo l'ipotesi che la risposta al glutammato osservata nel modello sh-parkin sia mediata da recettori KAR prevalentemente formati da subunità GluR6.

La specificità dell'anticorpo contro GluR6 è stata verificata trasfettando cellule HEK293T con un plasmide codificante per GluR6, analizzando i lisati cellulari totali mediante Western Blot; mentre cellule HEK293T non trasfettate sono state utilizzate come controllo. I risultati mostrano come l'anticorpo è specifico per la forma full-length della proteina ed è inoltre in grado di riconoscere anche le forme oligomeriche che GluR6 è capace di formare. Dato che l'anticorpo GluR6 utilizzato riconosce un epitopo che risiede tra gli aminoacidi 380-455 della proteina umana è possibile pensare che la banda a 45 kDa possa corrispondere ad un frammento proteolitico N-terminale.

La proteolisi appare come un altro meccanismo cellulare per regolare la concentrazione e la funzione delle proteine. In particolare è stato visto come la proteolisi parziale contribuisce alla regolazione altamente specifica dell'espressione e della funzione per diverse subunità dei recettori del Glutammato. Precisamente la proteolisi limitata può rivelare domini proteici che alterano la funzione del recettore e sono in grado di modulare la mobilità del recettore nella cellula (Meyer et al., 2003). Per esempio la subunità GluR1 è suscettibile alla proteolisi da parte della caspasi 8 simile a proteasi (Meyer et al., 2002), la subunità GluR3 è suscettibile al taglio da parte delle serin proteasi

(referenza), del Granzima B (Gahring et al., 2001) e al clivaggio da parte della γ -secretasi (Meyer et al., 2003).

Per dimostrare che la banda a 45 kDa sia effettivamente un frammento derivante dalla proteolisi della forma *full-length* di GluR6 abbiamo investigato da quale possibile clivaggio enzimatico il frammento potrebbe derivare.

Le cellule sono state quindi trattate con vari inibitori delle proteasi aggiunti al medium di coltura delle cellule a varie concentrazioni e a vari tempi indicati in letteratura .

Per valutare il possibile ruolo della degradazione lisosomale nella produzione del frammento, le cellule sono state trattate con ammonio cloruro e cloroquina (inibitori delle proteasi lisosomali), a concentrazioni rispettivamente di 50 mM e 50 μ M per 8 e 24 ore, e i lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi di Western Blot e colorati con un anticorpo specifico per GluR6. Tuttavia i risultati non sembrano mostrare variazioni nei livelli del frammento proteolitico di GluR6 all'interno del modello sh-parkin escludendo quindi il coinvolgimento di queste proteasi nella produzione di quest' ultimo (FIG.8A). E' stato ottenuto lo stesso risultato utilizzando un inibitore delle metalloproteinasi ad ampio spettro (GM6001) a tre diverse concentrazioni 10-16-18 μ M rispettivamente per 8 e 24 ore (FIG.8B), l'inibitore per la calpaina (ZVAD-FMK) e con uno ad ampio spettro delle caspasi (ALLM) utilizzati alle concentrazioni di 50 e 100 μ M per 24 ore (FIG.8C).

Infine abbiamo utilizzato due inibitori, uno per la β e uno per la γ -secretasi, rispettivamente alle concentrazioni di 50 μ M e 25-50-100 μ M per 24 ore. I lisati totali cellulari analizzati nuovamente per Western Blot con anticorpo specifico per GluR6 hanno mostrato risultati diversi; per quanto riguarda le cellule trattate con l'inibitore della β -secretasi II non si osserva alcuna variazione dei livelli di frammento proteolitico (FIG.9A). Al contrario le cellule trattate con inibitore della γ -secretasi VI mostrano una diminuzione significativa dei livelli del frammento proteolitico alla massima concentrazione utilizzata (100 μ M) indicando come in mancanza di questo enzima non è possibile il taglio proteolitico che genera il frammento (FIG.9B).

Nel modello cellulare sh-parkin quindi vi è un'alterata risposta al Glutammato mediata da un accumulo di recettori KAR composti da subunità GluR6 che mostrano un'alterato pattern rispetto alle cellule controllo. Tuttavia il modello cellulare immortalizzato

presenta i limiti di non rappresentare un modello fisiologico perfetto. A sostegno quindi dei risultati mostrati abbiamo voluto analizzare il pattern di GluR6 in tessuti cerebrali provenienti da pazienti mutati per la parkina e affetti da AR-JP. Abbiamo preparato quindi lisati proteici di corteccia cerebrale da due pazienti PD e da due controlli comparati per età. L'analisi di Western Blot dei lisati cerebrali con l'anticorpo specifico per GluR6 mostra aumentati livelli della proteina GluR6 nei tessuti di encefalo dei pazienti PARK2 mutati (FIG.10A) rispetto ai tessuti dei controlli e una serie di frammenti proteolitici a peso molecolare minore confermando quindi l'aumento dei livelli di GluR6 che avevamo visto precedentemente nel modello cellulare.

Infine abbiamo voluto cercare ulteriore conferma del nostro dato in tessuti provenienti da topo privo di parkina. Corteccia, cervelletto, striato estratti da topi privi di parkina, lisati e sottoposti ad analisi di Western Blot, non mostrano nessuna differenza significativa nel *pattern* di GluR6 rispetto agli stessi lisati ottenuti da topi *wild-type* (FIG.10B).

L'estremo C-terminale della parkina contiene un motivo di legame PDZ per cui le proteine con domini PDZ (PSD-95/discs large/ZO-1) sono in grado di interagire con essa. Infatti la parkina è in grado di interagire fra le altre con varie proteine PDZ tra cui la PSD 95 (referenza), la proteina PICK1 (Joch et al., 2007) e la proteina CASK (Fallon et al.,2002) tutte situate a livello della densità post sinaptica. D'altra parte anche i recettori del kainato contengono al loro C-terminale un motivo di legame PDZ che è in grado di legare le proteine già citate per la parkina che sono in grado di regolarne la funzionalità e la stabilità sinaptica. A tale proposito abbiamo ipotizzato che tra le due proteine prese in esame ci possa essere un coinvolgimento diretto e un'interazione che viene quindi a mancare nel momento in cui c'è il silenziamento della parkina.

Per verificare la presenza di un'effettiva interazione tra la parkina e GluR6 a livello del SNC è stata effettuata una co-immunoprecipitazione con un anticorpo specifico per la parkina partendo da lisati totali di encefalo di topo e usando un lisato ottenuto da topo *wild-type* come controllo negativo. I campioni ottenuti dall'immunoprecipitazione sono stati analizzati tramite Western Blot con anticorpi specifici per GluR6 e per la parkina per verificare la specificità dell'immunoprecipitazione. I dati ottenuti mostrano come la

parkina e GluR6 sono in grado di co-immunoprecipitare tra di loro e di non interagire nel caso in cui la parkina viene a mancare (nel lisato ottenuto da topo privo di parkina) (FIG.11A).

A conferma dell'interazione tra le due proteine e per verificare che l'interazione sia diretta abbiamo utilizzato un sistema eterologo quale le cellule HEK293T in cui la parkina è espressa a livelli molto bassi e secondo la letteratura non sembrano esprimere GluR6 endogeno (Motazacker et al., 2007). Sono state quindi trasfettate queste cellule solo con un plasmide codificante per la parkina o solo per GluR6 per evitare segnali aspecifici o con entrambe per verificare l'interazione e i lisati cellulari sono stati co-immunoprecipitati con un anticorpo per la parkina. L'analisi in Western Blot e la colorazione con un anticorpo contro GluR6 ha dimostrato come esiste un'interazione diretta tra le due proteine anche in un sistema eterologo quale le HEK293T, mentre la colorazione con un anticorpo contro la parkina dimostra la specificità della co-immunoprecipitazione (FIG.11B).

Infine a dimostrazione del fatto che GluR6 possa essere un possibile substrato della parkina e che possa essere ubiquitinato da quest'ultima abbiamo effettuato una co-immunoprecipitazione in lisati di *brain* umano controllo e PARK2 con un anticorpo specifico per l'ubiquitina. I campioni ottenuti sono stati analizzati mediante Western Blot con anticorpi specifici per GluR6 e per l'ubiquitina per verificare la specificità dell'immunoprecipitazione. I risultati ottenuti mostrano come l'anticorpo anti-ubiquitina è in grado di immunoprecipitare GluR6 a dimostrazione del fatto che GluR6 può essere ubiquitinato, inoltre nel lisato ottenuto da soggetto controllo è presente una quantità maggiore di GluR6 a peso molecolare maggiore (~ 118 kDa) rispetto a quello ottenuto da soggetto PARK2 a dimostrazione del possibile ruolo della parkina nell'ubiquitinazione di GluR6 e più in particolare nell'attacco di una sola molecola di ubiquitina.

Quindi trattando le cellule parentali, sh-LacZ e sh-parkin con MG132, l'inibitore del proteasoma alla concentrazione di 5 μ M fino a 4 ore, per verificare se in seguito ad ubiquitinazione si ha l'accumulo di GluR6 e analizzando i lisati mediante Western Blot con anticorpo contro GluR6, possiamo vedere come i livelli di GluR6 dopo trattamento

non risultano statisticamente diversi; quindi, come indicato anche dai dati precedenti, si può ipotizzare che GluR6 non viene poli-ubiquitinato dalla parkina e che quindi la sua ubiquitinazione non è destinata alla degradazione da parte del proteasoma ma piuttosto alla regolazione di altre funzioni, come ad esempio il *trafficking*.

DISCUSSIONE

La malattia di Parkinson (PD) è uno dei più comuni disordini neurodegenerativi, caratterizzato dalla progressiva e selettiva perdita di neuroni dopaminergici nella *substantia nigra pars compacta* (SNpc) e dalla presenza di inclusioni intracellulari, chiamate corpi di Lewy (Dawson and Dawson, 2003). La perdita di tali neuroni causa il progressivo blocco motorio, che include tremore, rigidità, e bradicinesia. Sebbene la maggioranza dei casi di PD sia sporadica, l'identificazione di mutazioni familiari legate a PD ha fornito un grosso aiuto nello studio della patogenesi della malattia (Cookson, 2005). Tra le mutazioni ereditarie scoperte quelle nel gene della parkina sembrano essere prevalenti e rendono conto di circa il 50 % dei casi di PD familiare (von Coelln et al., 2004a). La parkina è una E3 ligasi responsabile dell'aggiunta di catene di ubiquitina su specifici substrati che vengono così targettati per la degradazione da parte del proteasoma rappresentando in questo modo un importante legame tra l'aggregazione proteica ed il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) nella patogenesi del PD (Shimura et al., 2000; Zhang et al., 2000). Mutazioni nella parkina sono responsabili dell'insorgenza di parkinsonismo giovanile autosomico recessivo (AR-JP), forma giovanile di PD con caratteristiche patogenetiche peculiari e ben precise, in cui la parkina perde la sua attività ubiquitin ligasica e non riesce ad ubiquitinare i suoi substrati portando al loro accumulo (Cookson, 2003). L'accumulo di uno o più dei presunti substrati della parkina potrebbe risultare tossico per i neuroni catecolaminergici (Dong et al., 2003).

Nonostante i diversi substrati identificati e/o attribuiti alla parkina il meccanismo per cui mutazioni della parkina, che ne provocano la perdita di funzione, sono in grado di provocare la selettiva perdita dei neuroni dopaminergici alla base di AR-JP rimane tutt'ora sconosciuto.

E' stato dimostrato come il danno citotossico è una delle cause di neurodegenerazione implicate nella patogenesi del PD. I neuroni dopaminergici del SNc sono ricchi in recettori del glutammato e ricevono estensiva innervazione glutamatergica dalla corteccia e dal nucleo subtalamico (STN) e mostrano dei picchi di attività in risposta alla somministrazione esterna di glutammato (Rothstein et al., 1994; Johnson e al., 1992). Lesioni a questo livello disinibiscono il STN ed aumentano la frequenza d'attività di questi neuroni eccitatori (De Long 1990). Inoltre una riduzione nel metabolismo

energetico dovuta a difetti nella funzione mitocondriale è in grado di provocare la perdita del blocco di Mg^{2+} nei recettori NMDA che permette al glutammato di mediare un repentino influsso di calcio nella cellula.

Infine è stato dimostrato come la parkina sia in grado di proteggere i neuroni post mitotici dall'eccitotossicità mediata dai recettori del glutammato (Staropoli et al., 2003; Moszczynska et al., 2007) e in un recente studio è stato visto come la parkina sia in grado di regolare la funzionalità e la stabilità delle sinapsi eccitatorie aumentandone la vulnerabilità agli stimoli eccitotossici in caso di mutazioni (Helton et al., 2008). A tale proposito è ipotizzabile un ruolo protettivo della parkina, mediato dal suo coinvolgimento nel rimaneggiamento della sinapsi, nei confronti della tossicità neuronale mediata da glutammato che potrebbe essere alla base dell'insorgenza di AR-JP.

A sostegno di tale ipotesi e per meglio indagare il ruolo della parkina nell'insorgenza di questa patologia abbiamo creato un modello neuronale privo di parkina sfruttando la tecnica dell'RNA *interference* e abbiamo analizzato la risposta di questa linea cellulare (sh-parkin) alla somministrazione di glutammato proveniente dall'ambiente extracellulare.

Sono stati disegnati tre diversi interference per la parkina tutti e tre efficaci nel down-regolare l'espressione della proteina e abbiamo così creato una linea cellulare stabile a livelli impercettibili di parkina e una linea di controllo silenziata per un gene non presente nell'uomo, LacZ (sh-LacZ).

Per analizzare quindi la possibile aumentata vulnerabilità delle cellule prive di parkina ad uno stimolo eccitatorio esterno abbiamo analizzato la variazione di calcio intracellulare con un indicatore ad alta affinità Fluo4NW che ha mostrato come nella linea cellulare priva di parkina è presente un aumento rapido, transitorio e dose dipendente della concentrazione di calcio intracellulare rispetto alle cellule controllo. Inoltre gli stessi esperimenti effettuati in presenza di un chelante per gli ioni calcio (EGTA) aggiunto al buffer extracellulare hanno dimostrato come questo aumento derivi dall'entrata di calcio extracellulare e non dal rilascio dagli accumuli intracellulari, in quanto l'aggiunta del chelante è in grado di diminuire la concentrazione di calcio intracellulare.

I recettori del glutammato vengono divisi in due grandi sottogruppi a seconda del loro meccanismo d'azione in recettori metabotropici che agiscono tramite la regolazione di

proteine segnale e di secondi messaggeri all'interno della cellula e ionotropici che permettono il rapido passaggio di ioni nella cellula in seguito alla loro attivazione. A loro volta i recettori ionotropici si dividono in tre sottogruppi a seconda dell'agonista che è in grado di attivarli in: AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid), KAINATO ed NMDA (N-methyl-D-aspartate). Escludendo quindi i recettori metabotropici e concentrando la nostra attenzione sui recettori ionotropici abbiamo pensato di studiare più nel dettaglio la classe recettoriale responsabile di questo alterato ingresso intracellulare di calcio nelle cellule sh-parkin. A tale proposito gli esperimenti di misurazione del calcio intracellulare sono stati condotti in presenza di antagonisti per le diverse classi recettoriali e i risultati ottenuti hanno mostrato come solo la presenza di un antagonista selettivo per i recettori del KAINATO (KAR) è in grado di provocare la diminuzione del repentino ingresso di calcio intracellulare dopo trattamento con glutammato, indicando in tal modo questo tipo recettoriale come responsabile. Inoltre l'aggiunta di un desensitizzante di questi canali (Concanavalina A) è in grado di aumentare e rafforzare i picchi intracellulari di calcio ad ulteriore conferma del coinvolgimento di questa classe recettoriale nell'ingresso massivo di calcio nel nostro modello cellulare.

A conferma di questi dati è stata effettuata l'analisi elettrofisiologica dei due modelli cellulari in risposta alla perfusione con glutammato. Le registrazioni patch-clamp hanno evidenziato come le cellule sh-parkin presentano una corrente in risposta al glutammato più alta in maniera statisticamente significativa rispetto alle cellule sh-LacZ. Inoltre l'antagonista selettivo dei KAR è in grado di diminuire selettivamente questa corrente nel modello cellulare sh-parkin.

Per testare gli effetti del silenziamento della parkina sulla tossicità indotta dal glutammato, è stata effettuata l'analisi di vitalità cellulare tramite saggio MTS.

I risultati dimostrano come in presenza di glutammato e Concanavalina A, aggiunta per evitare la rapida desensitizzazione recettoriale, ci sia una massiva morte cellulare nelle cellule sh-parkin mentre nelle cellule controllo il trattamento con glutammato non sembra avere effetto sulla vitalità cellulare.

A questo punto è stato utile analizzare l'espressione delle diverse subunità dei recettori KAR in modo da poter identificare quale sia la subunità maggiormente espressa a livello di questo tipo cellulare e quale possa essere quella responsabile di questa alterata risposta al glutammato.

I recettori del KAINATO sono recettori ionotropici del glutammato composti dalla diversa combinazione di cinque subunità chiamate GluR5, GluR6, GluR7, che formano recettori omomerici funzionali e KA1 e KA2 che possono formare solo parte di un recettore funzionale quando si assemblano con almeno una delle subunità GluR5-GluR7 (Chittajallu et al., 1999; Lerma et al., 2001). Queste formano canali ionici che permettono il passaggio di Ca^{2+} in seguito all'editing dell'mRNA di una Glutammina nella regione del poro del canale. A differenza dei canali AMPA ed NMDA, che operano prevalentemente a livello postsinaptico e sono gli agenti chiave della trasmissione sinaptica glutamatergica rapida, i recettori del kainato hanno diverse funzioni che dipendono dalla loro localizzazione subcellulare. A livello del terminale presinaptico possono modulare sia la trasmissione eccitatoria che quella inibitoria (Chittajallu et al., 1999; Lerma et al., 2001). A livello postsinaptico mediano una componente lenta della trasmissione sinaptica e sono coinvolti nei meccanismi di plasticità (Lerma, 2003).

In seguito all'analisi dei livelli di messaggero delle varie subunità del glutammato sia nella linea cellulare parentale che nelle due linee silenziate con l'shRNA per la parkina e quello controllo, abbiamo potuto vedere come GluR6 sia la subunità prevalentemente espressa a dispetto di una bassissima espressione della subunità GluR7 e impercettibile di GluR5. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi dei livelli di espressione proteica mediante Western Blot con anticorpi specifici contro le diverse forme delle diverse subunità. Non sono state analizzate le subunità KA1 e KA2 in quanto come detto in precedenza non sono in grado di formare recettori omomerici funzionali. Tali risultati ci portano a concludere che a livello della nostra linea cellulare utilizzata SH-SY5Y e conseguentemente nelle due linee cellulari silenziate vi si trovano recettori KAR prevalentemente formati da subunità GluR6 e che i recettori coinvolti nell'alterata risposta al glutammato osservata nelle cellule sh-parkin possa essere mediata da recettori così composti.

In seguito all'analisi dei livelli di proteina GluR6 nella linea cellulare sh-parkin e nella linea di controllo sh-LacZ, abbiamo potuto vedere come nelle cellule silenziate vi sia un diverso pattern della proteina in analisi, in quanto oltre alla specie reattiva a più alto peso molecolare presente anche nelle cellule controllo vi è un'altra banda a peso molecolare più basso. Inoltre dall'analisi con diversi inibitori per i più comuni sistemi di proteolisi è emerso come questo frammento proteolitico viene ad essere prodotto in seguito all'azione della γ -secretasi. Già in precedenza dati di letteratura hanno riportato la possibilità di più bande immunoreattive di GluR6 all'analisi in Western Blot che in quel caso rappresentavano forme glicosilate della subunità recettoriale (Wenthold et al., 1994). Inoltre è stata vista la possibilità per la subunità GluR3 di essere regolata mediante proteolisi limitata, in seguito al clivaggio in due distinti siti da parte della γ -secretasi, che porta alla formazione di forme più corte che vengono glicosilate e trovate in associazione con altre subunità *full-length* dei GluR sia in cervello di topo che in colture primarie neuronali (Meyer et al., 2003). Quindi la subunità GluR6 potrebbe subire un particolare tipo di regolazione grazie alla proteolisi che, assieme ad altri tipi di modificazione quali la glicosilazione o la fosforilazione, può aumentare la fine regolazione alla quale devono sottostare le diverse subunità recettoriali del glutammato per rispondere ai meccanismi di plasticità sinaptica. Non è stato visto esattamente quando e dove il clivaggio viene effettuato, tuttavia in seguito alla separazione tra le proteine di membrana e quelle citoplasmatiche si identifica la presenza della specie clivata quasi unicamente in membrana suggerendo che il taglio proteolitico possa avvenire per lo più a livello del complesso recettoriale maturo e quindi funzionale; e questo potrebbe essere importante per l'attività di rimodellamento o di re-distribuzione dei recettori in compartimenti come i dendriti o le spine. Inoltre la sua presenza nella frazione arricchita anche nelle cellule controllo ci porta a pensare che questo clivaggio sia un meccanismo di regolazione fisiologico che viene però ad essere esasperato in assenza di parkina portando ad un aumento dei livelli di recettore funzionante e quindi ad un'augmentata attività di questi recettori con conseguente effetto citotossico intracellulare. A sostegno dell'augmentata presenza di GluR6 a livello delle cellule sh-parkin abbiamo pensato di verificarne l'espressione a livello del SNC umano utilizzando lisati di *brain*

ottenuti da due pazienti AR-JP e da due soggetti sani utilizzati come controllo. Il risultato ha confermato ulteriormente l'aumento dell'espressione di GluR6 e la presenza di frammenti proteolitici della stessa a dimostrazione che quanto visto nella linea cellulare non sia un artefatto dovuto al modello *in vitro*.

Tuttavia la stessa analisi in cervelletto, nigra, striato e corteccia provenienti da topo privo di parkina non mostrano significative differenze rispetto ai lisati ottenuti da topi *wild-type*. Questo tuttavia può essere spiegato facilmente dal fatto che il topo privo di parkina disponibile commercialmente non è considerato un buon modello (Perez et al., 2004) in quanto presenta deficit nigrostriatali visibili all'esame elettrofisiologico ma non presenta perdita di neuroni dopaminergici e soprattutto non ha nessuna manifestazione fenotipica di malattia neanche nell'età adulta (Goldberg et al., 2003).

Infine visti i dati di letteratura che dimostrano la presenza della parkina in sinapsi dove è in grado di legare numerose proteine con domini PDZ (Fallon et al., 2002) ed il suo ruolo nel regolare la funzionalità e la stabilità della sinapsi glutamatergica (Helton., 2008), abbiamo verificato la possibile interazione diretta tra la parkina e GluR6 mediante co-immunoprecipitazione dimostrando come le due proteine sono in grado di interagire sia in a livello del SNC (*brain* di topo) che in un sistema eterologo quale le HEK293.

Inoltre a dimostrazione del fatto che la parkina potrebbe ubiquitinare GluR6 abbiamo effettuato una immunoprecipitazione di tutte le proteine ubiquitinate a livello di *brain* ottenuto da un soggetto sano e da un soggetto PARK2 verificando come nel soggetto sano e quindi solo in presenza di parkina vi è un' aumentato livello di GluR6 ubiquitinato e quindi immunoprecipitato. Al contrario in assenza di parkina vi è una maggiore presenza di GluR6 nel surnatante a sostegno dell'ipotesi che in mancanza di parkina una parte di GluR6 non venga ubiquitinata e quindi co-immunoprecipitata dall'ubiquitina. Inoltre la forma ubiquitinata sembra presentare uno shift di peso di pochi kDa rispetto alla forma originale portando a pensare che il GluR6 possa subire solo l'attacco di una o comunque di poche molecole di ubiquitina. Infine il trattamento delle cellule sh-parkin e delle cellule controllo con l'inibitore del proteasoma MG132 non portano all'accumulo di GluR6 né nella sua forma full-length né nella sua forma clivata portando a pensare che l'ubiquitinazione di GluR6 non sia deputata alla sua degradazione quanto piuttosto

alla regolazione del suo *trafficking* e della sua messa in membrana in seguito all'aumentata suscettibilità del GluR6 per eventuali modificazioni post-traduzionali che ne regolano la stabilità.

La parkina è una E3 ubiquitin ligasi in grado di ubiquitinare molte proteine substrato. Tuttavia l'ubiquitinazione può avere diverse conseguenze fisiologiche che dipendono dal modo in cui l'ubiquitina viene legata ad una data proteina substrato, la conseguenza più comune è la poly-ubiquitinazione che porta alla degradazione della proteina da parte della subunità 26 S del proteasoma. In altri casi la monoubiquitinazione può regolare la degradazione indipendente dal proteasoma (Moore et al., 2008) oppure regolare la funzionalità di una data proteina su sue proteine partner (Joch et al., 2007), regolarne i livelli (Dehvari et al., 2008) o il suo trafficking in membrana (Fallon et al., 2006).

La maggior parte delle mutazioni associate a malattia sono considerate perdita di funzione in quanto impediscono l'interazione della parkina con E2, con cofattori o con le proteine substrato alterandone la localizzazione cellulare, l'attività catalitica o semplicemente la sua espressione (Doss-Pepe et al., 2005; Sriram et al., 2005., Hampe et al., 2006; Matsuda et al., 2006). In questo modo la perdita di funzione porta ad una mancata ubiquitinazione dei suoi substrati con conseguente accumulo di questi ultimi (Cookson, 2003). Inoltre l'accumulo di uno o più di questi substrati si pensa possa essere tossico per i neuroni catecolaminergici (Dong et al., 2003).

E' già stato visto in precedenza come GluR6 può essere ubiquitinato e come questo contribuisca alla sua corretta regolazione in superficie (Salinas et al., 2006).

I risultati ottenuti possono quindi indicare che la parkina potrebbe ubiquitinare GluR6 o più in particolare una sua forma clivata, contribuendo al trafficking del recettore funzionante in membrana piuttosto che alla sua degradazione. La mancanza della parkin porterebbe ad un alterato sorting e quindi ad un accumulo del recettore che provoca un'aumentata attività e una massiva entrata di calcio che risulta quindi tossica per la cellula e ne provoca la morte. I neuroni dopaminergici ne risulterebbero i più colpiti in quanto maggiormente suscettibili a danno eccitotossico da glutammato.

Tutto questo ci porta a candidare GluR6 come substrato per la parkina e ad attribuirgli un ruolo importante nella perdita dei neuroni dopaminergici che è alla base dell'insorgenza di AR-JP.

Figura.1

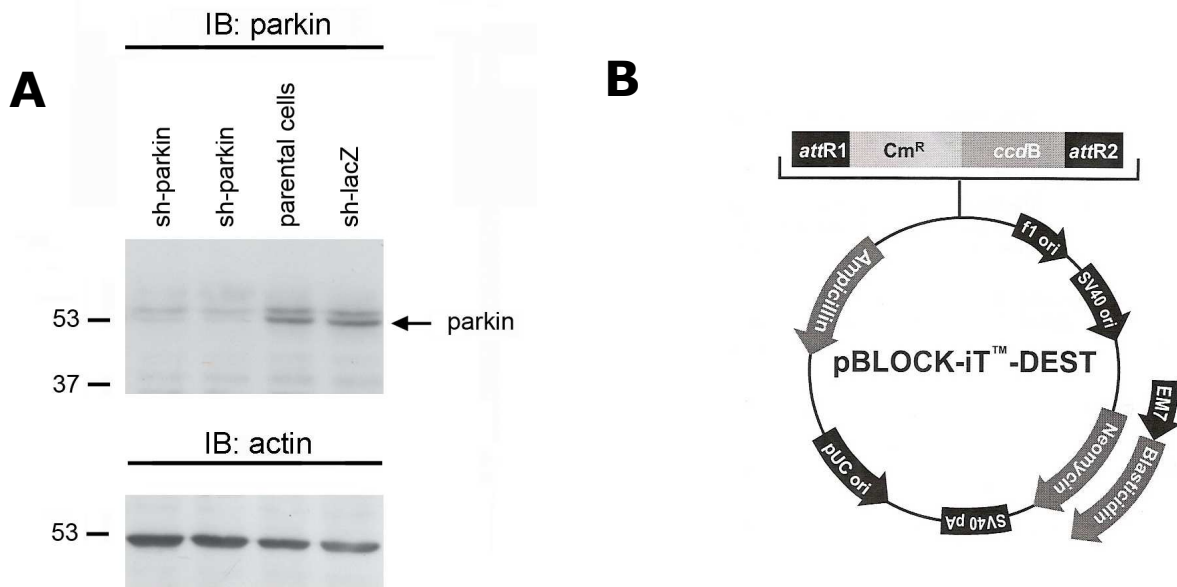


FIGURA.1 A) Analisi Western Blot dei livelli di parkina in lisati cellulari SH-SY5Y silenziate con sh-RNA specifico, come controllo sono state utilizzate cellule parentali e cellule silenziate con sh-LacZ.

B) Vettore di espressione pBLOCK-iT-DEST.

Figura.2

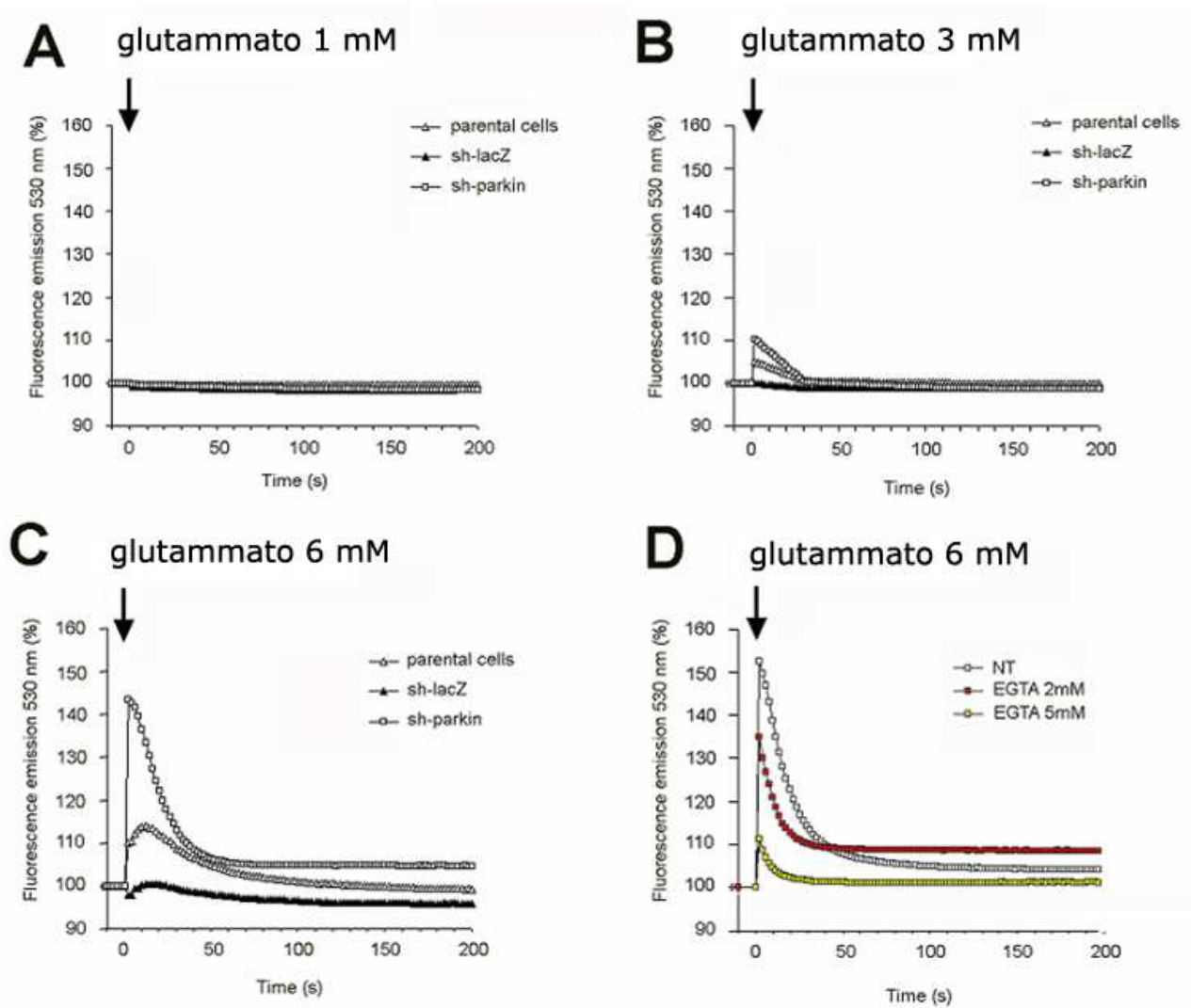


FIGURA.2 I grafici rappresentano i risultati dell'analisi di cellule sottoposte a trattamento con glutammato 1-6 mM con Fluo-4NW (A-B-C) e in presenza e assenza di EGTA (D). Le intensità di fluorescenza sono state normalizzate con la fluorescenza media registrata durante i 10 minuti che precedono l'aggiunta dell'agonista. Questi risultati sono rappresentativi di 6 esperimenti condotti in identiche condizioni. L'analisi statistica è stata effettuata attraverso test One Way ANOVA.

Figura.3

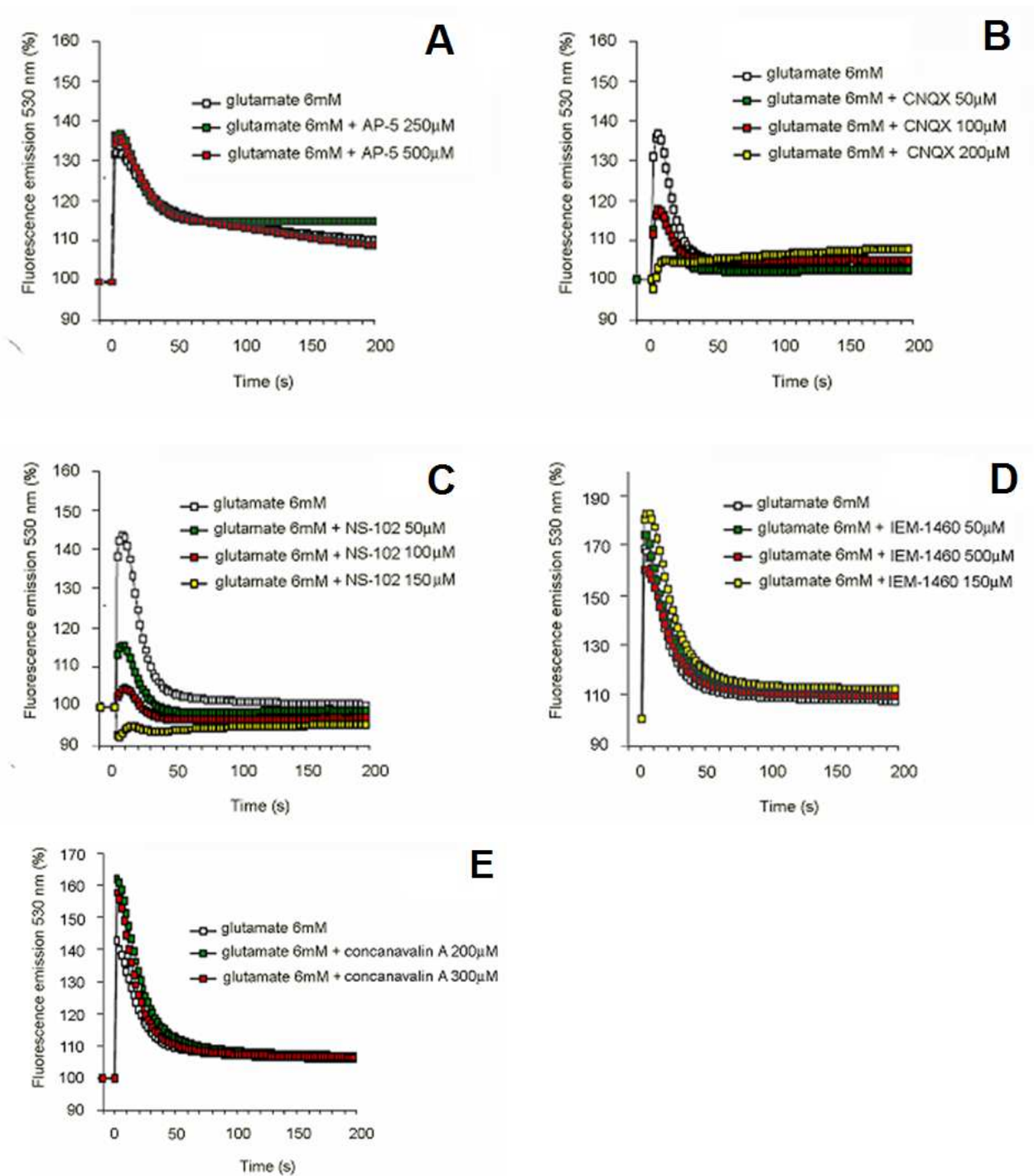


FIGURA.3 I grafici rappresentano i livelli di $[Ca^{2+}]_c$ in cellule sh-parkin trattate con glutammato 6mM in presenza di antagonisti dei recettori ionotropici del glutammato. Le cellule sono state trattate alternativamente con AP-5 (250-500 μ M) (A), CNQX (50-200 μ M), (B) NS-102 (50-150 μ M) (C) o IEM-1460 (50-500 μ M) (D), concanavalin A (200-300 μ g/mL) (E) per 30 minuti prima dell'aggiunta di glutammato. I risultati sono rappresentativi di 6 esperimenti condotti in identiche condizioni. L'analisi statistica è stata effettuata attraverso test One Way ANOVA.

Figura.4

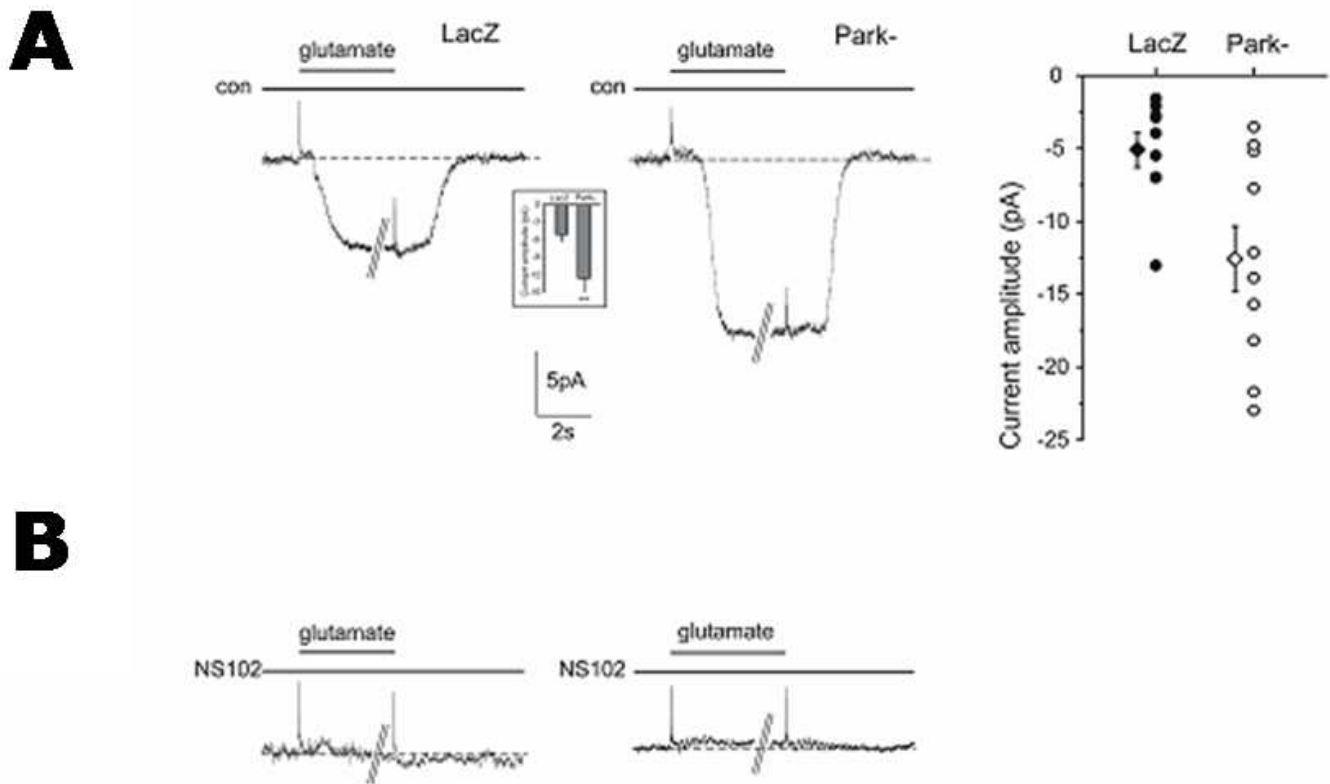


FIGURA.4 Il grafico in figura (A) mostra la risposta media al glutammato 6 mM in cellule sh-LacZ, a sinistra, ed sh-parkin, a destra. In figura (B) viene mostrato lo stesso esperimento condotto in perfusione dell'antagonista NS-102 (150 μM). Il grafico riporta la media ± il valore SEM per 10 cellule registrate; $p < 0.01$ tra le cellule sh-parkin e le cellule controllo.

Figura.5

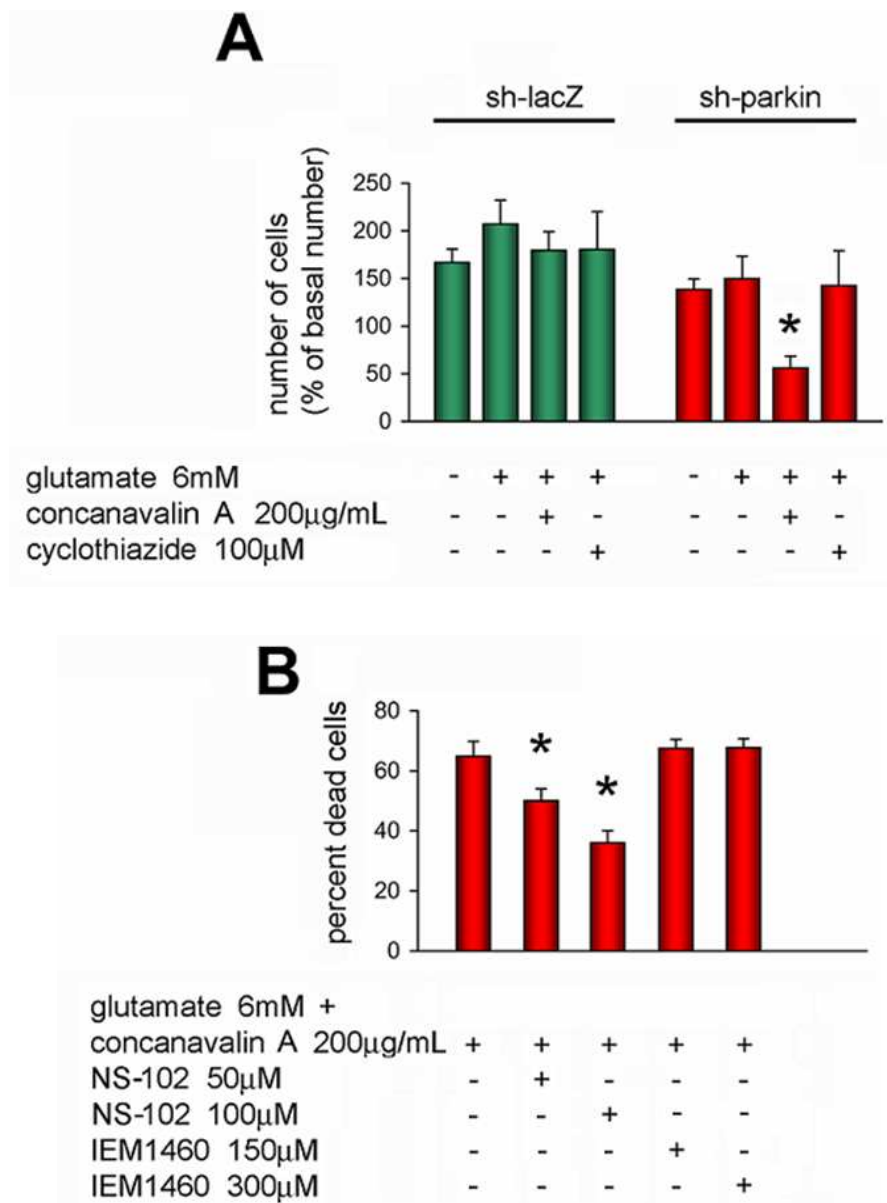


FIGURA.5 A) La vitalità cellulare è stata valutata con Coulter Counter assay 24 ore dopo trattamento con glutammato 6 mM o glutammato 6mM + concanavalina A (200 µg/mL) o glutammato 6mM + cyclothiazide 100µM. I dati sono stati normalizzati sul numero di cellule prima dei trattamenti e presentati come media ± SEM derivante da tre esperimenti indipendenti (* $p < 0.01$ cellule non trattate rispetto a cellule sh-parkin). B) La vitalità cellulare è stata valutata con Coulter Counter assay 24 ore dopo trattamento con glutammato 6 mM + concanavalina A (200 µg/mL) in presenza di NS-102 (50-100 µM) o IEM1460 (150-300 µM) I dati sono presentati come media ± SEM derivanti da tre esperimenti condotti in identiche condizioni (* $p < 0.01$ cellule non trattate rispetto a cellule trattate con glutammato + concanavalina A).

Figura.6

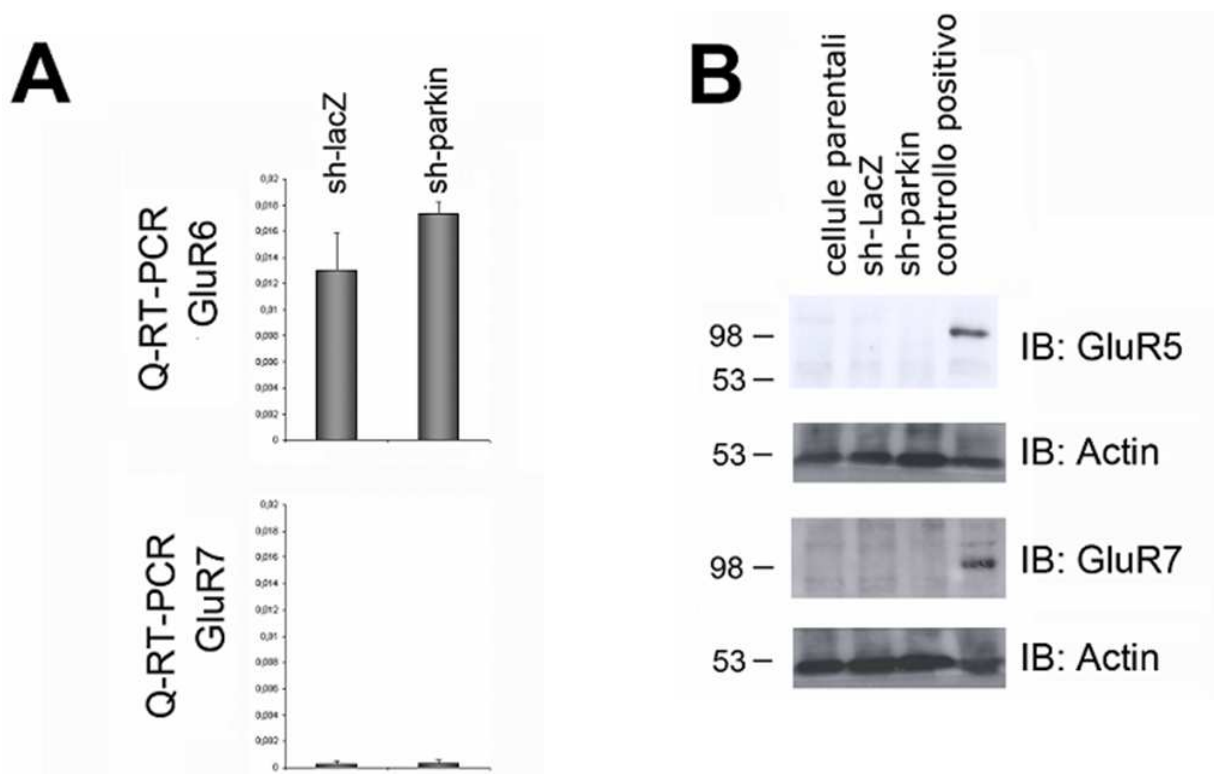


FIGURA.6 A) Analisi Real Time PCR per mRNA di GluR6 e GluR7. Il template di cDNA utilizzato era uguale per ogni reazione di PCR condotta con TaqMan Gene Expression Assay validata per assicurare una uguale efficienza di amplificazione. Nelle condizioni sperimentali utilizzate, il ciclo soglia era <28 per GluR6 in tutti i campioni e >30 per GluR7. B) Analisi di Western Blot per le subunità GluR5 e GluR7 in lisati di cellule parentali ed sh-parkin, come controllo positivo è stato utilizzato un lisato ottenuto da brain di topo. L'uguale caricamento delle proteine è stato verificato strappando la membrana e reincubandola con un anticorpo specifico per la β -actina.

Figura.7

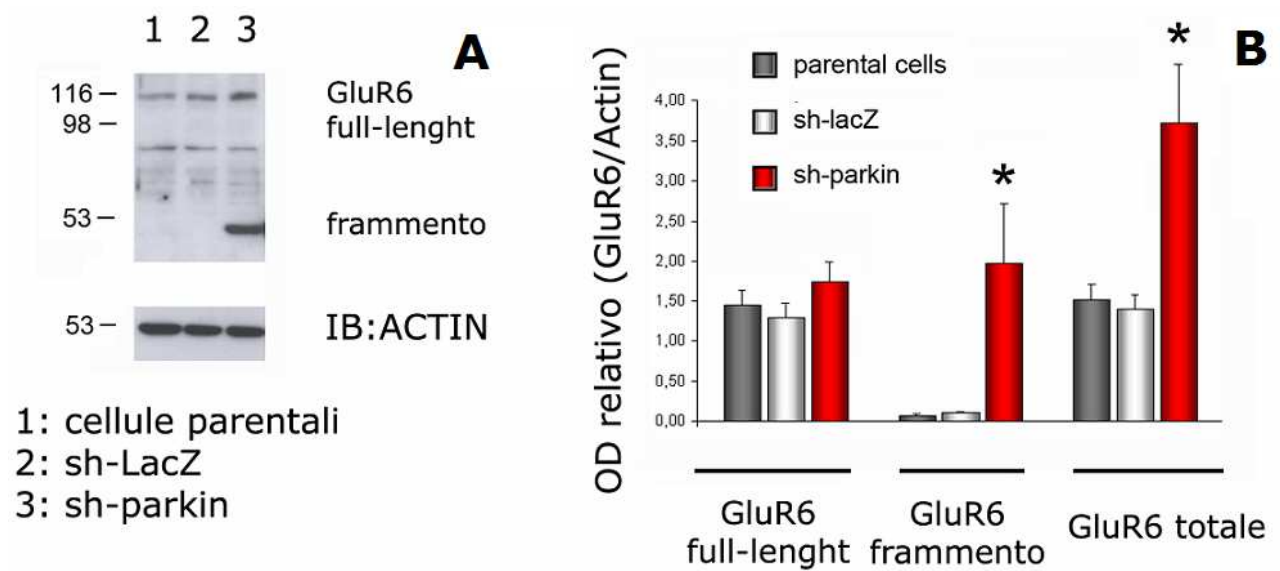


FIGURA.7 Analisi in Western Blot per la subunità GluR6 in lisati ottenuti da cellule parentali e cellule sh-parkin. L'uguale caricamento delle proteine è stato verificato strippando la membrana e reincubandola con un anticorpo specifico per la β -actina.

B) Analisi densitometrica della proteina full-length, del suo frammento proteolitico e dei livelli totali della subunità GluR6. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

Figura.8

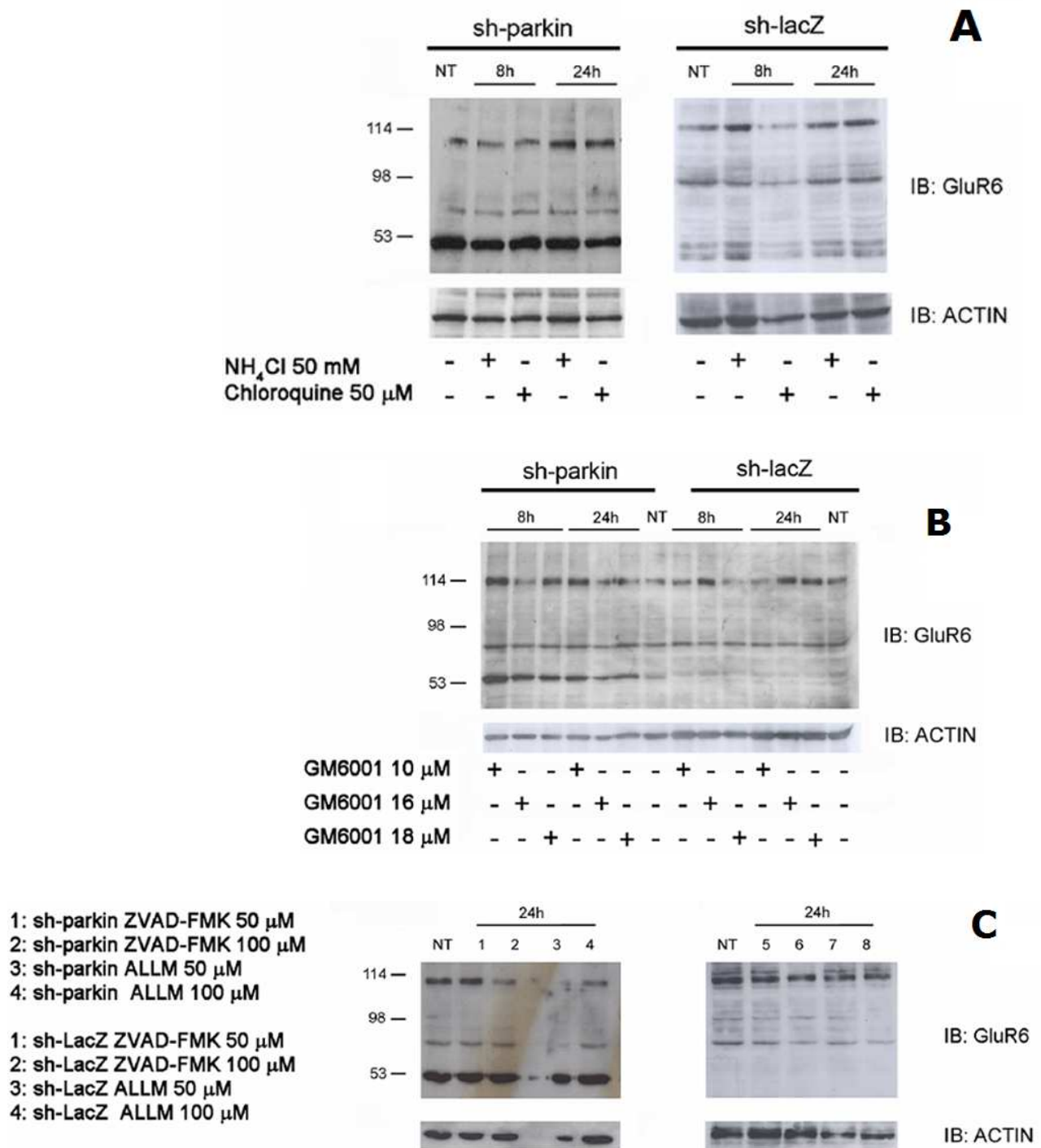


FIGURA.8 Analisi in Western Blot per la subunità GluR6 in lisati ottenuti da cellule parentali e cellule sh-parkin trattate con diversi inibitori a tempi e concentrazioni indicate in figura. L'uguale caricamento delle proteine è stato verificato stripping la membrana e reincubandola con un anticorpo specifico per la β-actina.

Figura.9

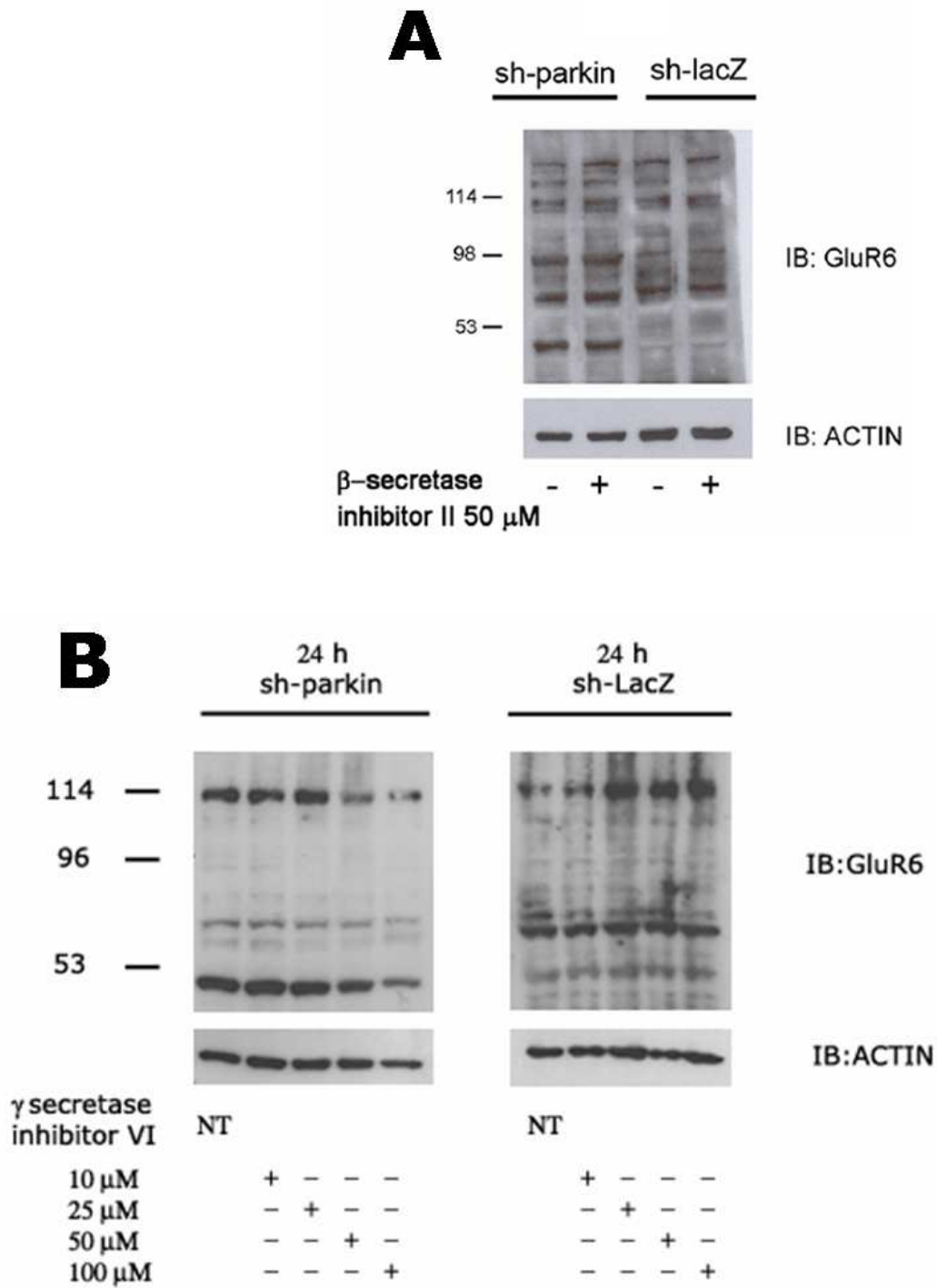


FIGURA.9 Analisi in Western Blot per la subunità GluR6 in lisati ottenuti da cellule parentali e cellule sh-parkin trattate con β-secretasi inhibitor II e γ-secretasi inhibitor VI a tempi e concentrazioni indicate in figura. L'uguale caricamento delle proteine è stato verificato strappando la membrana e reincubandola con un anticorpo specifico per la β-actina.

Figura.10

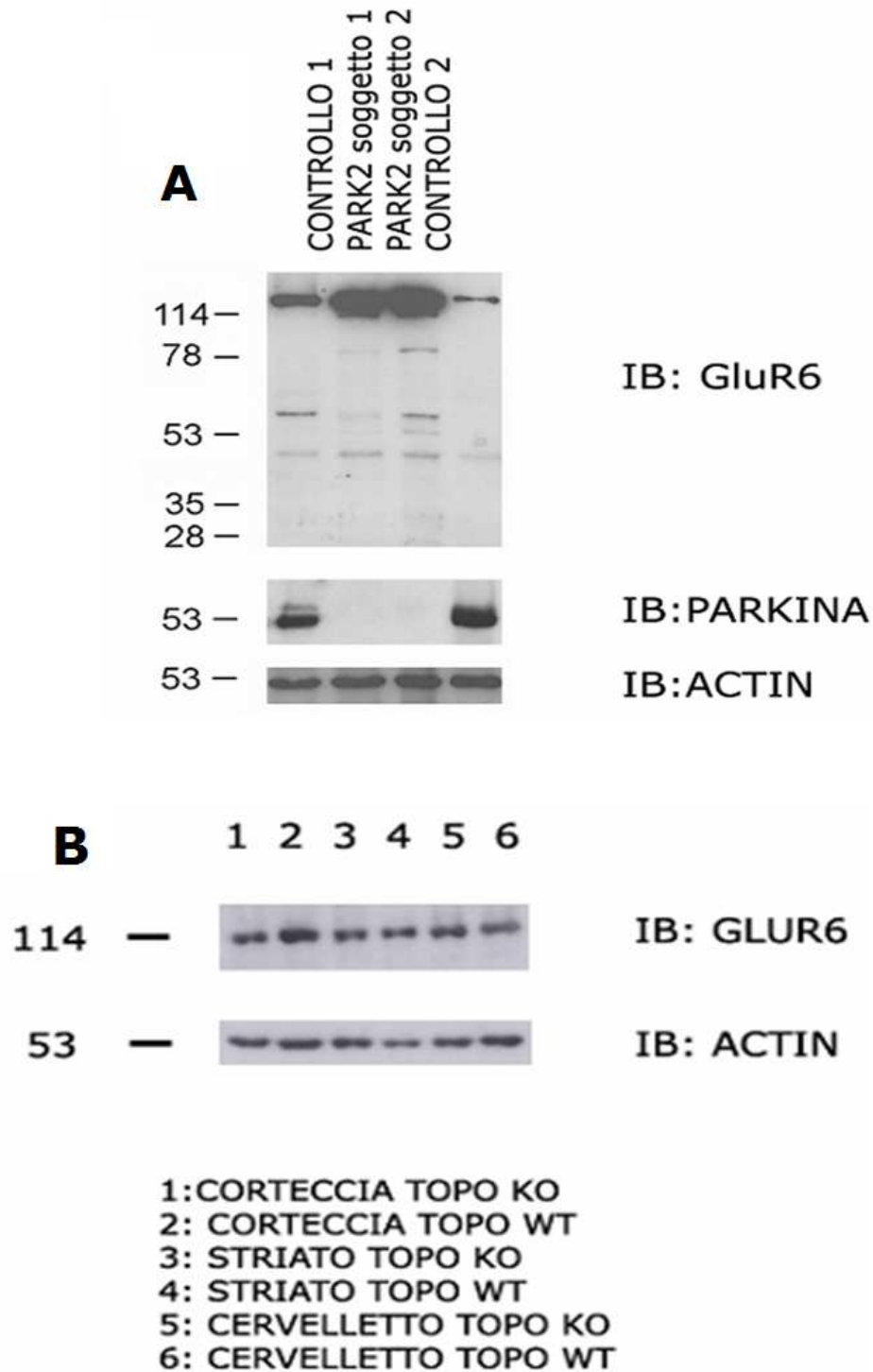


FIGURA.10 A) Analisi in Western Blot per la subunità GluR6 e la proteina parkina su lisati ottenuti da lisato totale di brain umano di due soggetti controllo e due soggetti PARK2. B) Analisi in Western Blot per la subunità GluR6 su lisati ottenuti da corteccia, striato e cervelletto di topo wild-type e privo di parkina. L'uguale caricamento delle proteine è stato verificato stripping la membrana e reincubandola con un anticorpo specifico per la β -actina.

Figura.11

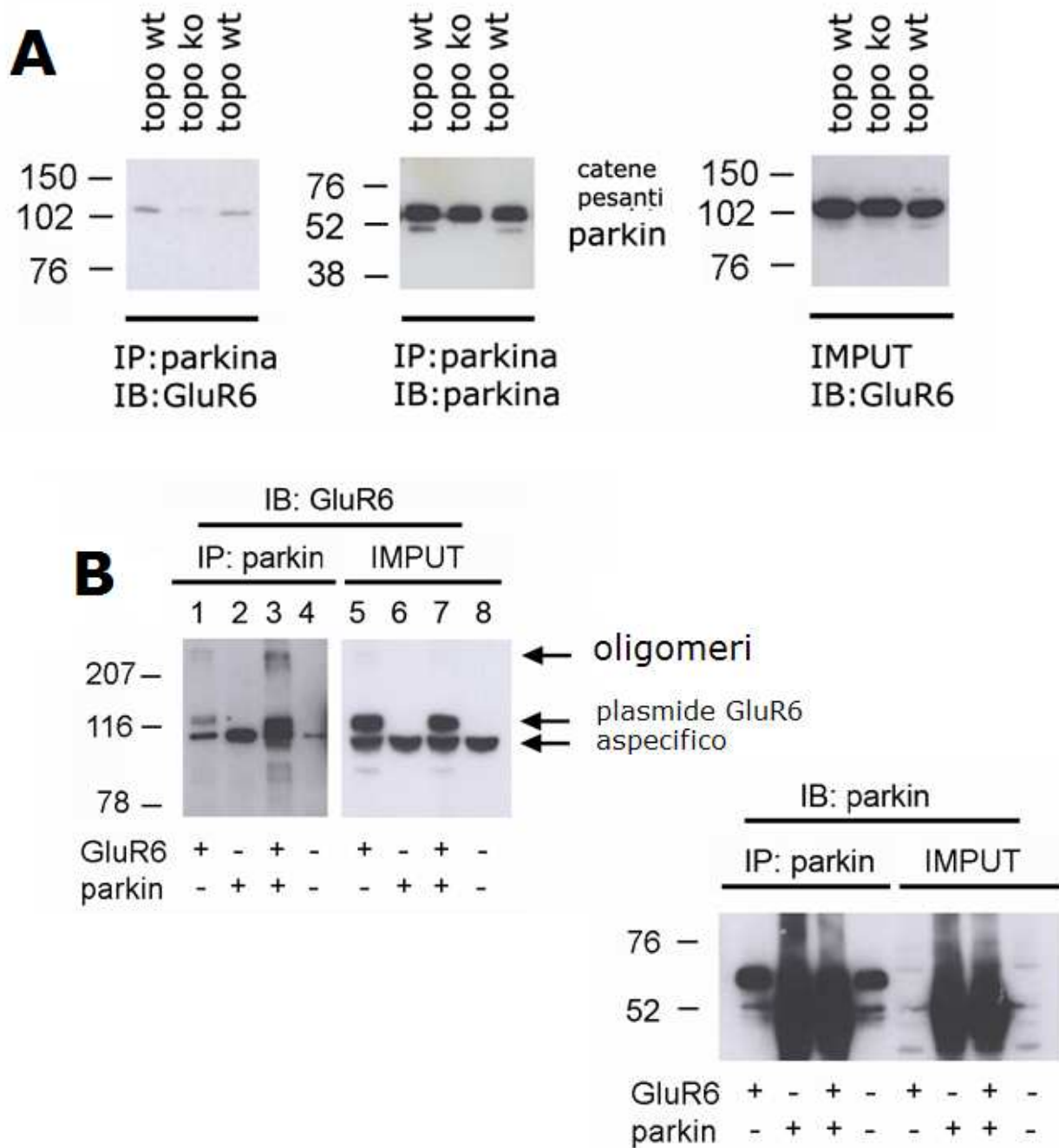


Figura.11 A) Gli estratti di brain murino wild-type e privo di parkina, sono stati sottoposti a saggio di co-immunoprecipitazione con un anticorpo specifico per la parkina sono stati analizzati in Western Blot con un anticorpo specifico per GluR6 e con l'anticorpo per la parkina per verificare la specificità dell'immunoprecipitazione. B) Gli estratti ottenuti da cellule HEK293T transfettate con un plasmide codificante la subunità GluR6 e la proteina parkina sono stati sottoposti a saggio di co-immunoprecipitazione con anticorpo specifico per la parkina e analizzati in Western Blot con un anticorpo specifico per GluR6 e con l'anticorpo per la parkina per verificare la specificità dell'immunoprecipitazione.

Figura.12

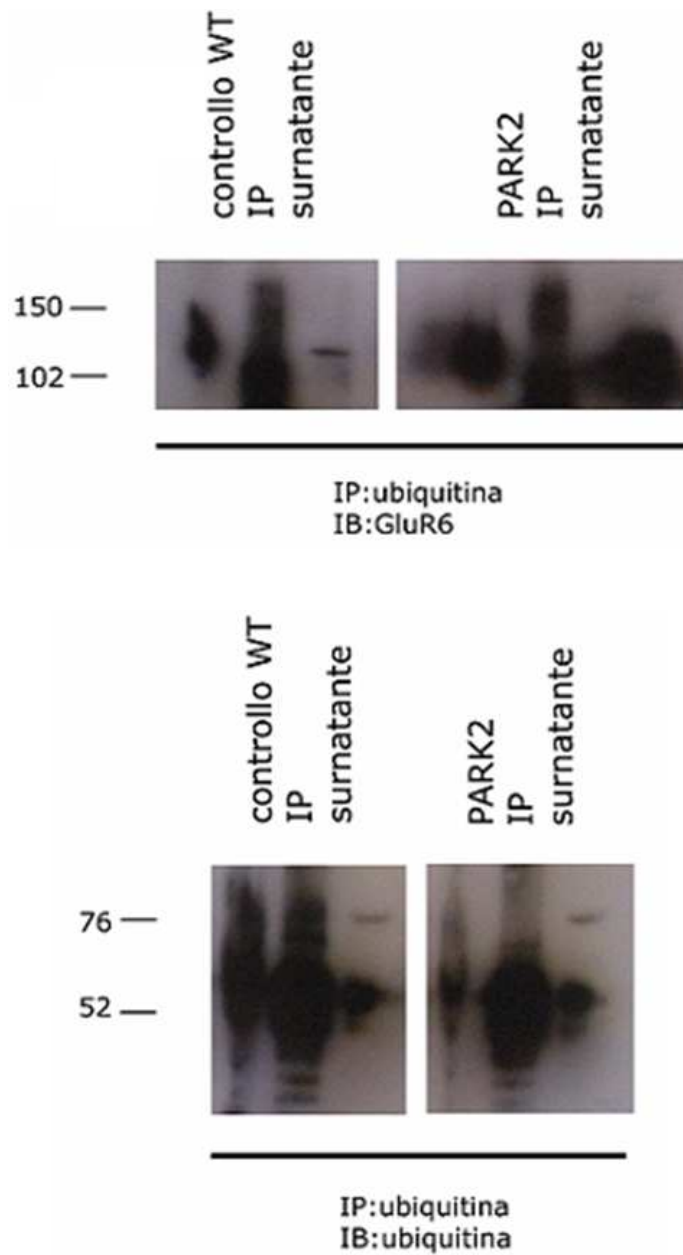


Figura.12 Gli estratti di brain umano ottenuto da soggetto controllo e PARK2, sono stati sottoposti a saggio di co-immunoprecipitazione con un anticorpo specifico per l'ubiquitina e analizzati in Western Blot con un anticorpo specifico per GluR6 e con l'anticorpo per l'ubiquitina per verificare la specificità dell'immunoprecipitazione.

Figura.13

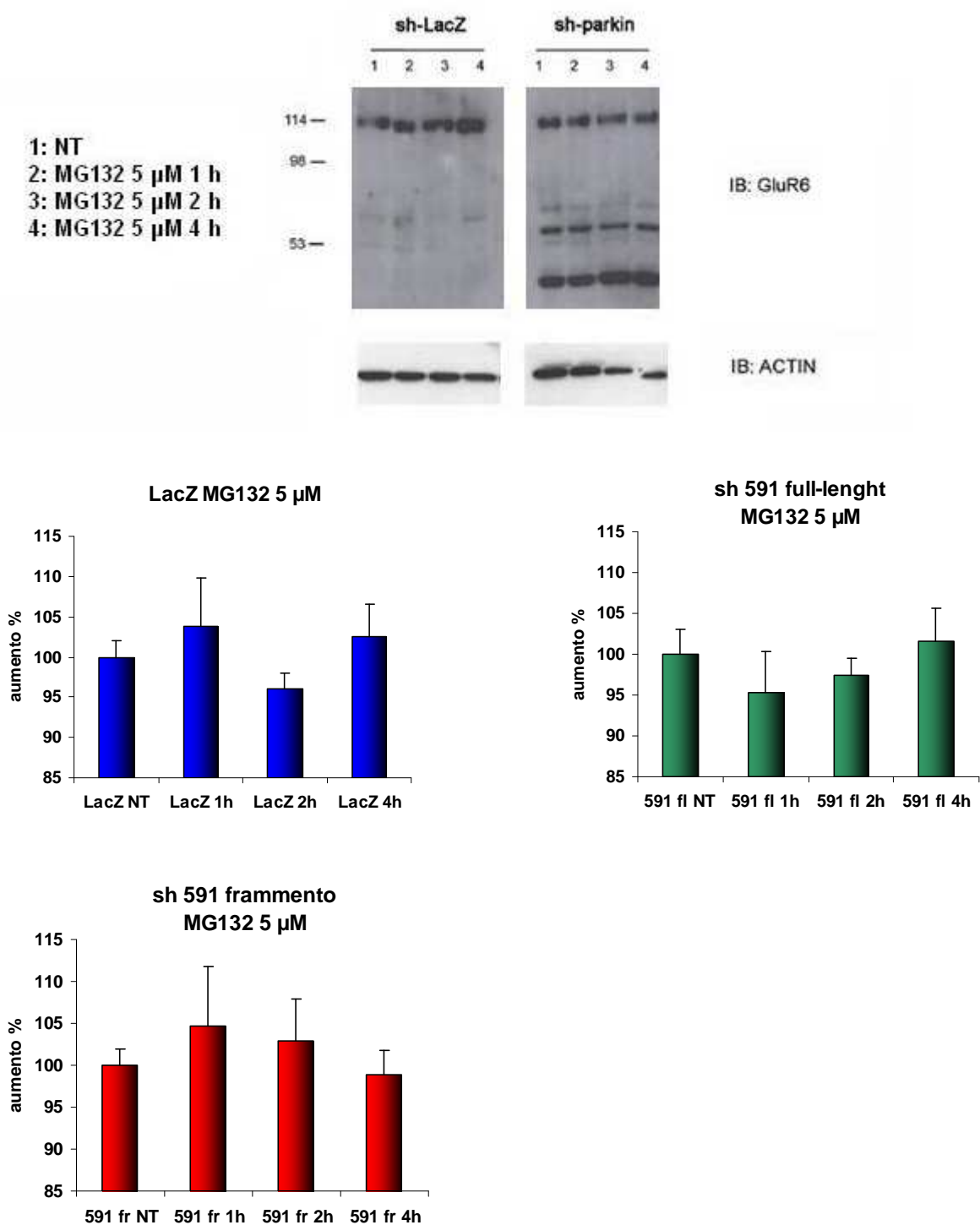


FIGURA.9 Analisi in Western Blot per la subunità GluR6 in lisati ottenuti da cellule sh-parkin e cellule controllo trattate con inibitore del proteasoma MG132 a tempi e concentrazioni indicate in figura. L'uguale caricamento delle proteine è stato verificato stripping la membrana e reincubandola con un anticorpo specifico per la β -actina.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, N.**, Lucking, C.B., Ricard, S., Durr, A., Bonifati, V., De Michele, G. (1999)
French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe.
Hum Molec Genet 8, 567-574
- Alves-Rodrigues, A.**, Gregori, L., Figueiredo-Pereira, M.E. (1998).
Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration.
Trends in Neuroscience 21: 516-520.
- Beal, M.F.** (1998).
Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis.
Ann. Neurol.(suppl):S110-S114.
- Ben-Neriah, Y.** (2002).
Regulatory functions of ubiquitination in the immune system.
Nature Immunology 3, 20-26.
- Bettler, B.**, Boulter, J., Hermans-Borgmeyer, I., O'Shea-Greenfield, A., Deneris, E.S., Moll, Borgmeyer, U., Hollmann, M., Heinemann, S.(1990)
Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development.
Neuron. Nov;5(5):583-95.
- Bras, J.**, Simon-Sanchez, J., Federoff, M., Morgadinho, A., Januario, C., Ribeiro, M., Cunha, L., Oliveira, C., and Singleton, A.B. (2009)
Lack of replication of association between GIGYF2 variants and Parkinson disease.
Hum.Mol.Gen.,18,341-346.
- Chittajallu, R.**, Braithwaite, S.P., Clarke, V.R., Henley, J.M. (1999)
Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function.
Trends Pharmacol Sci. Jan;20(1):26-35.
- Choi, P.**, Ostrerova-Golts, N., Sparkman, D., Cochran, E., Lee, J.M., Wolozin, B. (2000).
Parkin is metabolized by the ubiquitin/proteasome system.
Neuroreport 11,2635-2638.
- Chung, K.K.**, Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L., Dawson TM. (2001)
Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease.
Nat Med. Oct;7(10):1144-50.
- Comoli, E.**, Coizet, V., Boyes, J., Bolam, J.P., Canteras, N.S., Quirk, R.H., Overton, P.G., Redgrave, P. (2003)
A direct projection from superior colliculus to substantia nigra for detecting salient visual events.
Nat Neurosci. Sep;6(9):974-80.
- Cookson, M.R.**, Xiromerisiou, G., Singleton, A. (2005)

How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease.

Curr Opin Neurol. Dec;18(6):706-11.

Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalffy, B., De Franco, D.B., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y. (1998). Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1.

Nature Genetics 19: 148-154.

Darios, F., Corti, O., Lucking, C.B. (2003)

Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. Hum Mol Genet; 12:517-526.

Dauer, W., Przedborski, S.

Neuron. 2003 Sep 11;39(6):889-909.

Parkinson's disease: mechanisms and models.

Daw, M.I., Chittajallu, R., Bortolotto, Z.A., Dev, K.K., Duprat, F., Henley, J.M., Collingridge, G.L., Isaac, J.T. (2000)

PDZ proteins interacting with C-terminal GluR2/3 are involved in a PKC-dependent regulation of AMPA receptors at hippocampal synapses.

Neuron. Dec;28(3):873-86

Dawson, T.M., Dawson, V.L. (2003).

Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease.

Science 302:819-822.

Dekker, M.C., Eshuis, S.A., Maguire, R.P., Veenma-van der Duijn, L., Pruijm, J., Snijders, P.J., Oostra, B.A., van Duijn, C.M., Leenders, K.L.

PET neuroimaging and mutations in the DJ1 gene.

J.Neural Transm. 111, 1575-1581 (2004).

Dong, Z., Ferger, B., Paterna, J.C., Vogel, D., Furler, S., Osinde, M., Feldon, J., Büeler, H. (2003)

Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1.

Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 14;100(21):12438-43.

Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S. (1991)

Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA.

Nature. Jun 27;351(6329):745-8.

Fahn S.

Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome.

Ann N Y Acad Sci. 2003 Jun;991:1-14. Review.

Fallon, L., Moreau, F., Croft, B.G., Labib, N., Gu, W.J., Fon, E.A.. (2002).

Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain.

Journal of Biol Chemistry 277, 486-491.

Fallon, L., Belanger, C.M., Corera, A..T. (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.

Farrer MJ.

Genetics of Parkinson disease: paradigmshifts and future prospects.
Nat Rev Genet. 2006 Apr;7(4):306-18.

Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Hernandez, D., Forno, L., Gwinn-Hardy, K., Petrucelli, L., Hussey, J., Singleton, A., Tanner, C., Hardy, J., Langston, J.W. (2001).
Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations.
Annals in Neurology 50, 293-300.

Funayama, M., Hasegawa, K., Kowa, H., Saito, M., Tsuji, S., Obata, F.
A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1.
Ann.Neurol. 51,296-301 (2002).

Gahring, L., Carlson, N.G, Meyer, E.L, Rogers, S.W. (2001)
Granzyme B proteolysis of a neuronal glutamate receptor generates an autoantigen and is modulated by glycosylation.
J Immunol. Feb 1;166(3):1433-8.

Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacino, J.J., Cepeda, C., Lam, H.A., Bhatnagar, A., Meloni, E.G., Wu, N., Ackerson, L.C., Klapstein, G.J., Gajendiran, M., Roth, B.L., Chesselet, M.F., Maidment, N.T., Levine, M.S., Shen, J. (2003).
Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons.
J Biol Chem 278:43628-43635.

Goldberg, M.S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T.A., Kitada, T., Costa, C., Tong, Y., Martella, G., Tschertter, A., Martins, A., Bernardi, G., Roth, B.L., Pothos, E.N., Calabresi, P., Shen, J.
Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ1.
Neuron 45, 489-496 (2005).

Greene, J.C., Whitworth, A.J., Kuo, I., Andrews, L.A., Feany, M.B., Pallanck, L.J. (2003)
Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants.
PNAS; 100: 4078-4083.

Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., Brice, A., Corti, O.
Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity.
Hum Mol Genet. 2006 Jul 1;15(13):2059-75. Epub 2006 May 19.

Hayashi, S., Wakabayashi, K., Ishikawa, A., Nagai, H., Saito, M., Maruyama, M., Takahashi, T., Ozawa, T., Tsuji, S., Takahashi, H.. (2000).
An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene.
Mov Dis 15, 884-888.

Hedrich, K., Eskelson, C., Wilmot, B., Marder, K., Harris, J., Garrels, J. (2004)
Distribution, Type, and Origin of Parkin Mutations: Review and Case Studies.
Mov Dis 19: 1146-1157).

- Helton, T.D.**, Otsuka, T., Lee, M.C., Mu, Y., Ehlers, M.D. (2008)
Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase.
PNAS 105:19492-19497.
- Herb, A.**, Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., Seeburg, P.H. (1992)
The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits.
Neuron. Apr;8(4):775-85.
- Hershko, A.**, Ciechanover, A. (1998).
The ubiquitin system.
Annual Review of Biochemistry 67, 425-479.
- Hirbec, H.**, Perestenko, O., Nishimune, A., Meyer, G., Nakanishi, S., Henley, J.M., Dev, K.K. (2002).
The PDZ proteins PICK1, GRIP and Syntenin bind multiple glutamate receptor subtypes.
Journal of Biol Chemistry 277, 15221-15224.
- Hughes, A.J.**, Daniel, S.E., Lees, A.J.
Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease.
Neurology. 2001 Oct 23;57(8):1497-9.
- Huynh, D.P.**, Lee, M.H., Hattori, N., Kubo, S.I., Mizuno, Y., Halliwell, B., Jenner, P. (2002).
Effect of wild type or mutant parkin on oxidative damage, nitric oxide, antioxidant defenses, and the proteasome.
Journal of Biological Chemistry 277, 28572-28577.
- Imai, Y.**, Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y., 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., Ret, G., Joubert, C., Periquet, M., Araujo, F., Negroni, J., Casarejos, M.J., Canals, S., Solano, R., Serrano, A., Gallego, E., Sanchez, M., Deneffe, P., Benavides, J., Tremp, G.,
- Jiang, H.**, Ren, Y., Zhao, J., Feng, J. (2004)
Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis. Hum Mol Genet; 13:1745-1754.
- Joazeiro, C.A.**, Weissman, A.M. (2000).
RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity.
Cell 102, 549-552.
- Joch, J.**, Ase, A.R., Chen, C., MacDonald, P.A., Kontogianna, M., Corera, A.T., Brice, A., Sèguèla, P., Fon, E.A. (2007).
Parkin-mediated monoubiquitination of the PDZ protein PICK1 regulates the activity of acid-sensing ion channels.
Molecular Biol of the Cell 18: 3105-3118.
- Johansen, T.H.**, Drejer, J., Wätjen, F., Nielsen, E.O. (1993)

A novel non-NMDA receptor antagonist shows selective displacement of low-affinity [³H]kainate binding.
Eur J Pharmacol. Aug 15;246(3):195-204.

Johnson, S.W., Seutin, V., North, R.A.

Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump.
Science. 1992 Oct 23;258(5082):665-7.

Kahle, P.J., Leimer, U., Haas, C.

Does failure of parkin-mediated ubiquitination cause juvenile parkinsonism?
Trends Biochem Sci. 2000 Nov;25(11):524-7.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. (1998).

Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.
Nature 392, 605-608.

Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., Shono, M., Akaike, M., Azuma, H., Matsumoto T.

Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. (2006)
Hum Molec Genet; 15:883-895.

Lautier, C., Goldwurm, S., Durr, A., Giovannone, B., Tsiras, W.G., Pezzoli, G., Brice, A., and Smith, R.J. (2008)

Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease.
Am.J.Hum.Genet.,82,822-833.

Lavoie, B., Parent, A.

Pedunculopontine nucleus in the squirrel monkey: cholinergic and glutamatergic projections to the substantia nigra.
J Comp Neurol. 1994 Jun 8;344(2):232-41.

Lennox, G., Lowe, J., Morrell, K., Landon M, Mayer RJ. (1989).

Antiubiquitin immunocytochemistry is more sensitive than conventional techniques in the detection of diffuse Lewy body disease.
J.Neurol.Neurosurg. Psych. 52:67-71.

Lerma, J., Paternain, A.V., Rodríguez-Moreno, A., López-García, J.C. (2001)

Molecular physiology of kainate receptors.
Physiol Rev. Jul;81(3):971-98.

Lerma, J. (2003)

Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission.
Nat Rev Neurosci. Jun;4(6):481-95.

Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH.. (1998).

The ubiquitin pathway in Parkinson's disease.
Nature 395, 451-452.

Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z., and Lansbury, P.T. (2002).

The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility.

Cell 111, 209-218.

Lockhart, P.J., Lincoln, S., Hulihan, M., Kachergus, J., Wilkes, K., Bisceglia, G., Mash, D.C., Farrer, M.J.

DJ-1 mutations are a rare cause of recessively inherited early onset parkinsonism mediated by loss of protein function.

J. Med. Genet. 41, e22 (2004).

Lomeli, H., Wisden, W., Köhler, M., Keinänen, K., Sommer, B., Seeburg, P.H. (1992)

High-affinity kainate and domoate receptors in rat brain.

FEBS Lett. Jul 28;307(2):139-43.

Lotharius, J and Brundin, P.

Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicle and α -synuclein.

Nature Rev.Neurosci. 3, 932-942 (2002).

Lozano, A.M., Dostrovsky, J., Chen, R., Ashby, P. (2002)

Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption.

Lancet Neurol. Aug;1(4):225-31.

Lücking, C.B., Brice, A.

Alpha-synuclein and Parkinson's disease.

Cell Mol Life Sci. 2000 Dec;57(13-14):1894-908.

Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., Tanaka K.

J Biol Chem. 2006 Feb 10;281(6):3204-9. Epub 2005 Dec 8.

Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro.

Maraganore, D.M., Farrer, M.J., Hardy, J.A., Lincoln, S.J., Mc-donald, S.K., and Rocca, W.A. (1999).

Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease.

Neurology 53, 1858-1860

McNaught, K.S. and Jenner, P. (2001).

Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease.

Neurosci.Letts. 297:191-194.

Meyer, E.L., Gahring, L.C., Rogers, S.W. (2002)

Nicotine preconditioning antagonizes activity-dependent caspase proteolysis of a glutamate receptor.

J Biol Chem. Mar 29;277(13):10869-75.

Meyer, E.L., Strutz, N., Gahring, L.C., Rogers, S.W. (2003)

Glutamate receptor subunit 3 is modified by site-specific limited proteolysis including cleavage by gamma-secretase.

J Biol Chem. Jun 27;278(26):23786-96. Epub 2003 Apr 16.

Meylan, E and Tschopp, J.

The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress.

Trends Biochem.Sci. 30, 151-159 (2005).

Mizuno, Y., Hattori, N., Matsumine, H., (1998).
Neurochemical and neurogenetic correlates of Parkinson's disease.
Journal of Neurochemistry 71, 893-902.

Moore, D.J., West, A.B., Dikeman, D.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M. (2008)
Parkin mediates the degradation-independent ubiquitination of Hsp70.
J Neurochem. Jun;105(5):1806-19. Epub 2008 Feb 1.

Mori, H., Kondo, T., Yokochi, M., Matsumine, H., Nakagawa-Hattori, Y., Miyake, T., Suda, K.,
Mizuno, Y. (1998).
Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q.
Neurology 51, 890-892.

Muftuoglu, M., Elibol, B., Dalmizrak, O. (2004)
Mitochondrial complex I activity and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations.
Mov Disord; 19:544-548.

Murphy, T.H., De Long, M.J., Coyle, J.T. (1991)
Enhanced NAD(P)H:quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress.
J Neurochem. Mar;56(3):990-5.

Nagatsu, T., Sawada, M.
Cellular and molecular mechanisms of Parkinson's disease: neurotoxins, causative genes, and inflammatory cytokines.
Cell Mol Neurobiol. 2006 Jul-Aug;26(4-6):781-802. Epub 2006 Jul 6.

Najim al-Din, A.S., Wrickat, A., Mubaidin, A., Dasouki, M. And Hiari, M. (1994)
Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia:Kufor-Rakeb syndrome.
Acta Neurol.Scand., 89, 347-352.

Pagano, M. (1997).
Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway.
FASEB Journal 11, 1067-1075.

Pankratz, N., Nichols, W.C., Uniacke, S.K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P.M. and Foroud, T. (2002)
Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations.
Am.J.Hum.Genet.,71, 124-135.

Park, J., Lee, S.B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.M., Chung, J. (2006) Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin.
Nature; 441:1157-1161.

Pawlyk, A.C., Giasson, B.I., Sampathu, D.M., Perez, F.A., Lim, K.L., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Palmiter, R.D., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. (2003)
Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age.
J Biol Chem; 278:48120-48128.

- Perez, F.A.**, Curtis, W.R., Palmiter, R.D. (2005)
Parkin-deficient mice are not more sensitive to 6-hydroxydopamine or methamphetamine neurotoxicity.
BMC Neurosci; 6:71.
- Periquet, M.**, Lücking, C., Vaughan, J. (2001)
Origin of the mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from Founder effects.
Am J Hum Genet 68:617-626.
- Periquet, M.**, Latouche, M., Lohmann, E. (2003)
Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism.
Brain 126: 1271-1278.
- Petit, A.**, Kawarai, T., Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, St George-Hyslop P, Tandon A.
Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson's disease-related mutations.
J.Biol.Chem. 280, 34025-34032 (2005)
- Petrucelli, L.**, O'Farrell, C., Lockhart, P.J. (2002).
Parkin protects against the toxicity associated with over-expression of mutant α -synucleina:proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons.
Neuron 36:1007-1019.
- Pickart, C.M.**. (2001).
Mechanisms underlying ubiquitination.
Annual Review of Biochemistry 70, 503-533.
- Pidoplichko, V.I.**, and Dani, J.A. (2006).
Acid sensitive ionic channels in midbrain dopamine neurons are sensitive to ammonium, which may contribute to hyperammonemia damage.
PNAS 103: 11376-11380.
- Plun-Fraveau, H.**, Klupsch, K., Moiso, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N. (2007)
The mitochondrial protease Htra2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1.
Nat. Cell Biol., 9, 1243-1252.
- Priel, A.**, Selak, S., Lerma, J., Stern-Bach, Y. (2006)
Block of kainate receptor desensitization uncovers a key trafficking checkpoint.
Neuron. Dec 21;52(6):1037-46.
- Poewe, W.**
Treatment of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia.
Mov. Disord. 20, S77-S82 (2005).
- Rooney, T.A.**, Brice, A., Garcia de Yébenes, J. (2003)
Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse.
Hum Mol Genet. Sep 15;12(18):2277-91. Epub 2003 Jul 22.

- Ramirez, A.**, Heimbach, A., Grundemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L.P., Goebel, I., Mubaidin, A.F. (2006)
Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2 encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase.
Nat.Gen.,38, 1184-1191
- Rodriguez, M.C.**, Obeso, J.A., Olanow, C.W. (1998).
Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection.
Ann Neurol 44(suppl):S175-S188.
- Rothstein J.D.**, Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hober, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W. (1994)
Localization of neuronal and glial glutamate transporters.
Neuron. Sep;13(3):713-25.
- Schlesinger, F.**, Tammema, D., Krampfl, K., Bufler, J.(2005)
Two mechanisms of action of the adamantane derivative IEM-1460 at human AMPA-type glutamate receptors.
Br J Pharmacol. Jul;145(5):656-63
- Schubert, U.**, Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W., Bennink, J.R.. (2000).
Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes.
Nature 404, 770-774.
- Sheardown, M.J.** (1993)
The pharmacology of AMPA receptors and their antagonists.
Stroke. Dec;24(12 Suppl):I146-7; discussion I153-4.
- Shimura, H.**, Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K., Suzuki, T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nature Genetics 25, 302-305.
- Singleton, A.B.**, Farrer, M., Johnson, J., Singleton, A., Hague, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Peuralinna, T., Dutra, A., Nussbaum, R., Lincoln, S., Crawley, A., Hanson, M., Maraganore, D., Adler, C., Cookson, M.R., Muentert, M., Baptista, M., Miller, D., Blancato, J., Hardy, J., Gwinn-Hardy, K.
 α -synuclein locus triplication causes Parkinson's disease.
Science 302, 841 (2003).
- Sommer, B.**, Burnashev, N., Verdoorn, T.A., Keinänen, K., Sakmann, B., Seeburg, P.H. (1992)
A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate.
EMBO J. Apr;11(4):1651-6.
- Staropoli, J.F.**, McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., Abeliovich, A
Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity.
Neuron. 2003 Mar 6;37(5):735-49.
- Strauss, K.M.**, Martins, L.M., PlunFavreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszoleck, Z., Müller, T., Bornemann, A. (2005)
Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease.
Hum.Mol.Genet.,14, 2099-2111.
- Tan, J.M.**, Dawson, T.M.

Parkin blushed by PINK1.
Neuron 2006; 50:527-529.

Thomas, B., Von Coelln, R., Mandir, A.S. (2007)
MPTP and DSP-4 susceptibility of substantia nigra and locus coeruleus catecholaminergic neurons in mice is independent of parkin activity.
Neurobiol Dis;26:312-322

Van Den Eeden, S.K., Tanner, C.M., Bernstein, A.L., Fross, R.D., Leimpeter, A., Bloch, D.A., Nelson, L.M.
Am J Epidemiol. 2003 Jun 1;157(11):1015-22.
Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity.

Verdoorn, T.A., Johansen, T.H., Drejer, J., Nielsen, E.O. (1994)
Selective block of recombinant glur6 receptors by NS-102, a novel non-NMDA receptor antagonist.
Eur J Pharmacol. Sep 15;269(1):43-9.

Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W.
The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. (1999)
Annu Rev Biochem.;68:1015-68.

von Coelln, R., Dawson, V.L., Dawson, T.M. (2004)
Parkin-associated Parkinson's disease.
Cell Tissue Res. Oct;318(1):175-84. Epub 2004 Jul 30.

Wang, M., et al., (2001).
Developmental changes in the expression of parkin and UbcR7, a parkin-interacting and ubiquitin-conjugating enzyme, in rat brain.
J Neurochem 77: 1561-1568.

Wemmie, J.A., Chen, J., Askwith, C.C., Hruska-Hageman, A.M., Price, M.P., Nolan, B.C., Yoder, P.G., Lamani, E., Hoshi, T., Freeman, J.H. Jr, Welsh, M.J. (2002)
The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory.
Neuron. Apr 25;34(3):463-77.

Wemmie, J.A., Askwith, C.C., Lamani, E., Cassell, M.D., Freeman, J.H., Welsh, M.J. (2003).
Acid-sensing ion channel 1 is located in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning.
J Neurosci. 23: 5496-5502.

Wenthhold, R.J., Valory, A., Trumphy, W., Petralia, R.S. (1994)
Biochemical and assembly properties of GluR6 and KA2, two members of the kainate receptor family, determined with subunit-specific antibodies.
The Journal of Biological Chemistry 269: 1332-1339.

West, A.B., Maidment, N.T. (2004)
Genetics of parkin-linked disease.
Hum Genet; 114:327-336.

Wang, C., Ko, H.S., Thomas, B., Tsang, F., Chew, K.C., Tay, S.P., Ho, M.W., Lim, T.M., Soong, T.W., Pletnikova, O., Troncoso, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Lim, K.L. Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function.

Hum Mol Genet. 2005 Dec 15;14(24):3885-97. Epub 2005 Nov 8.

Winklhofer, K.F., Henn, I.H., Kay-Jackson, P.C., Heller, U., Tatzelt, J.
Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones.

J Biol Chem. 2003 Nov 21;278(47):47199-208. Epub 2003 Sep 12

Wong, L.A., Mayer, M.L. (1993)

Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- and kainate-preferring glutamate receptors.

Mol Pharmacol. Sep;44(3):504-10.

West, A.B., Moore, D.J., Biskup, S., Bugayenko, A., Smith, W.W., Ross, C.A., Dawson, V.L., Dawson, T.M.. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 102,16842-16847 (2005).

Xiong, Z.G.(2004).

Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels.

Cell 118:687-698.

Xiong, Z.G., Zhu, X.M., Chu, X.P., Minami, M., Hey, J., Wei, W.L., MacDonald, J.F., Wemmie, J.A., Price, M.P., Welsh, M.J., Simon, R.P. (2004)

Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels.

Cell. Sep 17;118(6):687-98.

Yamada, K.A., Tang, C.M. (1993)

Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents.

J Neurosci. Sep;13(9):3904-15

Yang, Y., Nishimura, I., Imai, Y., Takahashi, R., Lu, B. (2003)

Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in Drosophila.

Neuron. Mar 27;37(6):911-24.

Yang, F., Jiang, Q., Zhao, J., Ren, Y., Sutto, M.D., Feng J. (2005)

Parkin stabilizes microtubules through strong binding mediated by three independent domains.

J Biol Chem. Apr 29;280(17):17154-62. Epub 2005 Feb 28.

Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L., 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.

PNAS;97:13354-13359.

