

Étude de la protéine PINK1 dans la maladie d'Alzheimer et le cancer cérébral

Thomas Goiran

▶ To cite this version:

Thomas Goiran. Étude de la protéine PINK1 dans la maladie d'Alzheimer et le cancer cérébral. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT: 2016AZUR4153. tel-01674221

HAL Id: tel-01674221 https://theses.hal.science/tel-01674221

Submitted on 2 Jan 2018 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Apuc

École doctorale ED85 Unité de recherche : UMR7275

Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Science de la Vie de l'UNIVERSITE COTE D'AZUR

Thomas Goiran

Etude de la protéine PINK1 dans la maladie d'Alzheimer et le Cancer Cérébral

Dirigée par Cristine Alves Da Costa

Soutenue le 21 décembre 2016 Devant le jury composé de :

Alves da costa
Checler
Corti
Kienlen-Campard
Plun-Favreau

IPMC IPMC ICM UCL Louvain UCL Londres Directrice de thèse Président du jury Examinatrice Rapporteur Rapportrice

Résumé

Un tiers de la population européenne est touché par au moins un trouble du cerveau. En effet, la maladie d'Alzheimer, et les gliomes, représentent respectivement le syndrome de démence et les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'homme.

Plusieurs études épidémiologiques ont montré l'existence d'une corrélation inverse entre le risque de développer une maladie neurodégénérative et un cancer cérébral. Ceci suggére la présence de dénominateurs moléculaires communs entre ces pathologies. Dans les deux cas, un dysfonctionnement mitochondrial est rapporté, représentant une caractéristique partagée par ces deux troubles neurologiques.

La protéine kinase mitochondriale PINK1 responsable, lorsqu'elle est mutée, d'une forme précoce et familiale de la maladie de Parkinson, est particulièrement impliquée dans les processus de maintien de l'homéostasie mitochondriale.

Par conséquent, les mécanismes moléculaires régulant PINK1 ainsi que leurs impacts au cours des désordres mitochondriaux répertoriés dans la maladie d'Alzheimer et les tumeurs cérébrales, ont suscité un intérêt central, lors de ma thèse.

Au cours de ce travail, nous avons examiné certaines des fonctions mitochondriales de PINK1, associées au maintien de l'homéostasie mitochondriale dans un contexte « Alzheimerisé ». Nous mettons en évidence un rôle de la γ -sécrétase dans la physiologie mitochondriale en controllant la régulation transcriptionnelle de PINK1 par l'AICD, le fragment généré conjointement avec le peptide amyloïde toxique A β , à partir du précurseur β APP. Nous montrons de surcroît, l'initiation de cette régulation par la parkine.

Nous avons également mis en évidence dans des modèles in vitro et in vivo, une régulation transcriptionnelle négative de PINK1 par p53, le suppresseur de tumeur fréquemment muté dans les cancers humains. Nous mettons en évidence l'existence potentielle d'une voie responsable de la dérégulation des mécanismes autophagiques opérants dans les cancers cérébraux.

Abreviations

 $\Delta \Psi m$: Potentiel membranaire mitochondrial

- **6OHDA** : 6 hydroxydopamine
- **ADAM** : A Disintegrin and Metalloprotease
- **ADDLs** : $A\beta$ Derived Diffusible Ligans
- ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNmt : Acide Désoxyribonucléique Mitochondrial

- ADP : Adénosine Diphosphate
- AFT : AICD/Fe65/Tip60 / Complexe trimérique

AG : Appareil de Golgi

AID / AICD : APP IntraCellular Domain / domaine intracellulaire de l'APP

APH-1 : Anterior Pharynx-Defective 1 / (sous-unité de la γ-sécrétase)

APLP : APP-like Protein

APP : Protéine Précurseur de l'Amyloïde β

- **ARN** : Acide RiboNucléique
- ARNm : Acide RiboNucléique Messager
- ARNt : Acide RiboNucléique de Transfert

Atg : Autophagy-related Gene / gène relatif à l'autophagie

ATP : Adénosine TriPhosphate

AVs : Vacuole Autophagique

 $A\beta$: Amyloïde Beta ; peptide amyloïde

BACE : Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme 1

Beclin-1 : coiled-coil, moesin-like Bcl-2 interacting protein / Orthologue mammifère de Atg6

CCCP : Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone ; inhibiteur phosphorylation oxydative

 ${\bf ClpX}$: Case inolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit / protéase mitochondriale

CMA : Chaperone mediated autophagy / autophagie médiée par des protéines chaperones

CTF : Fragment additionnel C-Terminal

Cyt c : Cytochrome c

DJ-1: protein déglycase; PARK7

Dnm1l / Drp1 : Dynamin-1-like protein ; dynamin related protein 1 / protéine de fission mitochondriale

ERGIC : Compartiments intermédiaires Réticulum endoplasmique-appareil de Golgi

Fe65 : Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1

Fis1 : Mitochondrial fission 1 protein / protéine de fission mitochondriale

FOXO3a : Forkhead box subgroup O3 / facteur de transcription

GABARAP : Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein / protéine de la machinerie autophagique

GFP : Green Fluorescent protein / protéine fluorescente verte

 $GSK3\beta$: Glycogen synthase kinase 3 beta

GTPase : Petites GTPases ; hydrolase

H₂O₂: Péroxyde d'hydrogène

HCT : Human colorectal carcinoma cell / cellule de carcinome colorectale humaine

HDAC : Histone désacétylase

HEK : Human embyonic Kidney / cellule de rein embryonnaire humain

HepG2 : Hepatocellular carcinoma cells / cellules de carcinome hépatocellulaire

Htra2/Omi : 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2a/omi

IBR : In Between Ring

IDE : *l'insulin*-degrading enzyme

IMM : Membrane interne mitochondriale

IMS : Espace inter-membranaire mitochondrial

KPI : Domaine Kunitz protease inhibitory / Domaine de l'APP

LC3/MAPL1LC3A : Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A / proteine de la machinerie autophagique

L-dopa : Levodopa

LIR : LC3-interacting region / site d'intéraction avec la protéine LC3

LTD : Long-term depression / depression à long terme

LTP : Long-term potentialisation / potentialisaion à long terme

MA : Maladie d'Alzheimer

MAMs : Mitochondria-associated ER-membranes / point de contact entre la mitochondrie et le RE

MARK2 : microtubule affinity-regulating kinase 2 / protéine kinase

MCU : Mitochondrial calcium uniporter / transporteur de calcium

MEF : Mouse embryonic fibroblast / fibroblaste embryonnaire de souris

Mff : Mitochondrial fission factor / proteine de fission mitochondriale

Mfn : Mitofusines / protéine de fission mitochondriale

MG132: N-[(2S)-4-méthyl-1-[[(2S)-4-méthyl-1-[[(2S)-4-méthyl-1-oxopentan-2-yl]amino]loxopentan-2-yl] amino]-1-oxopentan-2-yle]carbamate de benzyle / inhibiteur du protéasome

MiD49 : Mitochondrial dynamics proteins of 49 kDa / Protéine de fission mitochondriale

MiD51 : Mitochondrial dynamics proteins of 51 kDa / Protéine de fission mitochondriale*

Milton : Glycosylphosphatidylinositol

MP : Maladie de Parkinson

MPP : Mitochondrial processing peptidase ; matrix processing peptidase

mPTP : Mitochondrial permeability transition pore / pore membranaire mitochondrial

MPTP: 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine / neurotoxine

MTS : Séquence de signal mitochondriale

NCT : Nicastrine /protéine du complexe y sécrétase

NdufA10: NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1

NEP: Neprilysine / enzyme de degradation de l'A β

NF-κB : nuclear factor-kappa B

NICD : Notch Intracellular Domain / domaine intracellulaire de Notch

Notch: protéine transmembranaire

OMM : Membrane externe mitochondriale

Opa : Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial ; mitochondrial dynamin like GTPase ; Optic atrophy 1 / proteine de fusion mitochondriale

p53: Protéine de 53kDa / facteur de transcription ; suppresseur de tumeur

 $\ensuremath{\text{P62/SQSTM}}$: Sequestosome 1 ubiquitin-binding protein p62 / protéine 62kDa / protéine autophagique

PARK : Parkinson disease protein

PARL : Presenilins-associated rhomboide-like / protease mitochondriale

PEN-2 : presenilin enhancer 2 / protéine du complexe γ sécrétase

PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1

PPARGC1A/PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 alpha

PS : preseniline

PTB : Phosphotyrosine-binding domains / Domaine de liaison phosphotyrosine

PTEN : Phosphatase and tensin homolog mutated in multiple advanced cancers 1

RE : Reticulum endoplasmique

REP : domaine represseur

RHOT1/Miro : Mitochondrial Rho GTPase 1

RING : Really Interesting New Gene

ROS : Reactive oxygen species / dérivés réactifs de l'oxygène

Ser : Sérine

SH-SY5Y : SK-N-SH / Neuroblastome

SNC : Système nerveux central

Thr : Thréonine

TIM & TOM : Complexe de transport composé de TIM et TOM

 $\ensuremath{\text{TIM}}$: Translocase of the inner membrane / Transporteur de la membrane interne mitochondriale

Tip60 : Histone acetyltransferase KAT5

TM : Domaine transmembranaire

TOM : Translocase of the outer membrane / Transporteur de la membrane externe mitochondriale

Tom7 : Mitochondrial import receptor subunit TOM7

TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase

UBL : Ubiquitin Like Domain / domaine inhibiteur de la parkine

UBR : ubiquitin-protein ligase E3 component n-recognin

UPS : Système ubiquitine-protéasome

VDAC : Voltage-dependent anion channels / Protéine de la membrane externe mitochondriale

Sommaire

RESUME			
ABREVIA	тю	NS	
SOMMAI	RE		
LISTE DES	S FI	GURES	
PREAMB	ULE		1
INTRODU	лст	ION	2
I. LE		NTROLE QUALITE DES MITOCHONDRIES	2
А	Ge	énéralités sur les mitochondries	2
1	00	Historique	2
1. 2		Caractéristiques générales	2
2.		Structure mitochondriale	4
	a.	Structure générale	.4
	b.	La matrice mitochondriale	4
	c.	L'espace intermembranaire	5
	d.	La membrane mitochondriale externe	5
	e.	La membrane mitochondriale interne	5
	f.	Les crêtes mitochondriales	6
В.	La	dynamique mitochondriale	7
1.		La fusion mitochondriale	7
	a.	Mfn 1/2	8
	b.	Opa1	8
	c.	Les modifications post-traductionnelles des protéines de fusion	9
2.		La fission mitochondriale	9
	a.	Drp1 / Dnm1	9
	b.	Les modifications post-traductionnelles des protéines de fissions	9
3.		La dynamique mitochondriale et la mitophagie	10
С.	La	Mitophagie 1	2
1.		Principe	12
2.		Les récepteurs mitophagiques	13
3.		p62/SQSTM1	14

	4.	La cascade PINK1/parkine /p62	14
II.	PTE	N INDUCED KINASE 1 : PINK1	15
A.	. <i>I</i>	Historique	15
В.	. (Généralités : du gène à l'activité kinase de PINK1	15
	1.	Le locus PARK6 : gène de PINK1	15
	2.	Les Mutations de PINK1	15
	3.	L'ARNm de PINK1	16
	а	. Expression de l'ARNm de PINK1	16
	b	. Régulation de l'ARNm de PINK1	16
	4.	La protéine PINK1	17
	а	. Structure protéique de PINK1	17
	b	. Répartition tissulaire de PINK1	18
	С	. Les modifications post-traductionnelles protéiques	19
		i. Clivage et protéolyse de PINK1	19
		ii. L'activité kinase de PINK1 : les substrats	21
		iii. L'autophosphorylation de PINK1	21
С.	L	es différentes fonctions de PINK1	21
	1.	PINK1: un senseur et contrôleur de la santé mitochondriale	23
	2.	PINK1 et la dynamique mitochondriale	26
	3.	Le trafic mitochondrial	28
	4.	La respiration mitochondriale	29
	5.	La voie de signalisation calcique	31
	6.	La fonction anti-apoptotique de PINK1	32
	7.	L'ubiquitination et le repliement protéique.	34
	8.	La transmission synaptique	36
	9.	La régulation du cycle cellulaire	37
III.	LES	DEFAUTS MITOCHONDRIAUX ET L'IMPLICATION DE PINK1 DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER	37
A.	. L	a Mitochondrie au cœur du développement de la MA	38
	1.	Les défauts mitochondriaux dans la MA : Description macroscopique	38
	2.	La cascade amyloïde et dysfonctionnement mitochondrial dans la MA	41
	а	. La cascade amyloïde	41
		i. Généralités	41
	b	. La βAPP : la protéine précurseur du peptide Aβ	41
		i. La biologie de la βAPP	41

	ii.	La localisation et le trafic de la βAPP	. 43
	iii.	Les mutations de l'APP	. 44
	iv.	La protéolyse de l'APP	. 45
		La voie non amyloidogénique	. 45
		La voie amyloidogénique	. 46
с.	Le	s Métabolites de la βAPP	. 50
	i.	Le peptide Aβ	. 50
	ii.	La dégradation du peptide A β	. 51
	iii.	Les motifs essentiels de l'APP	. 52
	iv.	Le domaine intra-cellulaire de la βAPP : l'AICD	. 52
	۷.	La production de l'AICD	. 53
	vi.	La protéolyse de l'AICD	. 53
	vii.	Les fonctions d'AICD	. 54
	viii.	Le clivage de l'APP en AICD transcriptionnellement actif ou inactif	. 55
3.	Les	défauts mitochondriaux dans la MA : liaison moléculaire	. 57
a.	Le	s présénilines	. 57
b.	Ľ	APP et ses métabolites	. 58
	i.	Le peptide Aβ dans la mitochondrie	. 60
	ii.	L'Aβ et le transport mitochondrial	. 61
	iii.	L'Aβ et la dynamique mitochondriale	. 62
	iv.	Aβ et l'autophagie / mitophagie	. 63
с.	La	parkine dans la MA	. 64
d.	La	protéine PINK1 dans la MA	. 65
	۷.	La régulation du niveau de PINK1 dans des cerveaux «alzheimerisés»	. 65
	vi.	La voie de signalisation PS-PTEN-PINK1	. 66
	vii.	La protéine PINK1 interagit avec la protéine Beclin1	. 66
	viii.	La protéine PINK1 interagit avec la protéine PGC1- α	. 67
IV. LES D	EFAU	TS AUTOPHAGIQUE ET IMPLICATION DE PINK1 DANS LE CANCER	67
A. N	1alad	lies neurodégénératives et cancer : un mécanisme commun des voies	
cellula	ires c	ommunes et/ou une balance entre la survie et la mort cellulaire	. 67
B. L'	auto	phagie dans le cancer	. 68
1.	Aut	ophagie et répression de la tumorigénèse	. 68
2.	Ľau	itophagie et activation de la tumorigénèse	. 69
3.	La n	nitophagie et la dynamique mitochondriale dans le cancer	. 70

C		<i>р5</i> .	3, un dénominateur moléculaire commun aux pathologies neurodégénérative	S
е	t cc	ance	r	. 71
	1.		p53 et autophagie dans le cancer	. 72
		a.	p53 et le contrôle qualité des mitochondries	. 73
		b.	p53 dans la dynamique mitochondriale	. 73
		c.	p53 et autophagie	. 73
Ľ).	L'iı	nplication de PINK1 dans le cancer	. 74
	1.		La voie PTEN-FOXO3a-PINK1	. 74
	2.		Implication de PINK1 dans le cancer	. 75
		a.	Expression de PINK1 dans le cancer	. 75
		b.	Les mutations de PINK1 associées au cancer	. 76
		c.	Associations de PINK1 avec d'autres gènes liés au développement tumoral	. 76
		d.	Les fonctions de PINK1 associées au cancer	. 76
		i	La fonction PINK1 anti-apoptotique	. 76
		i	i. PINK1 régule les processus de tumorigénèse : la prolifération, le cycle cellulaire	?,
		I	invasion, la migration cellulaire	. 77
OBJEC	TIF	S		. 78
OBJEC ETUDI	CTIF Es e	S XPI	ÉRIMENTALES	. 78 . 79
objec etudi l'Aic	CTIF Es e D C	S Expi	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION	78 79
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN	CTIF ES E D C ISC	S Expi Con RIP	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER	78 79 80
objec etudi L'Aic TRAN I.	TIF ES E D C ISC	S EXPI CON RIP	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER	78 79 80
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I.	CTIF ES E D C ISC IN RF	S EXPI	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION	. 78 . 79 . 80 . 80
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I. II.	CTIF ES E D C ISC IN RE	S EXPI CON RIP	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION	. 78 . 79 . 80 . 80 . 80
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I. II. LA REI	CTIF ES E D C ISC IN RE PRE	S EXPI CON RIP TROI	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION TATS ON DE L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR P53 IMPLIQUE LA REGULATION	. 78 . 79 . 80 . 80 . 80
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I. II. LA REI TRAN	CTIF ES E D C ISC IN RE PRE SCR	ES EXPI CON RIP TROI ESSI RIPT	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION TATS ON DE L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR P53 IMPLIQUE LA REGULATION IONNELLE DE PINK1	. 78 . 79 . 80 . 80 . 80 . 83
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I. II. LA REI TRANS	CTIF ES E D C ISC IN RE PRE SCR IN	ES EXPI CON RIP TROI ESUL ESSI RIPT	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION TATS ON DE L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR P53 IMPLIQUE LA REGULATION IONNELLE DE PINK1	. 78 . 79 . 80 . 80 . 80 . 80
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I. II. LA REI TRAN I. I.	CTIF ES E D C ISC IN RE SCR IN RE	ES EXPI CON RIP TROI ESUL RIPT TROI	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION TATS ON DE L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR P53 IMPLIQUE LA REGULATION IONNELLE DE PINK1 DUCTION	. 78 . 79 . 80 . 80 . 80 . 83 . 83 . 83
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I. II. LA REI TRAN I. I. II. UISCU	CTIF ES E D C ISC IN RE SCR IN RE	ES EXPI CON RIP TROI ESSI RIPT TROI ESUL CON	ÉRIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION TATS DN DE L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR P53 IMPLIQUE LA REGULATION IONNELLE DE PINK1 DUCTION	. 78 . 79 . 80 . 80 . 80 . 83 . 83 . 83 . 83
OBJEC ETUDI L'AIC TRAN I. II. LA REI TRAN I. II. UISCU ANNE	CTIF ES E D C ISC IN RE SCR IN RE SCR	ES EXPI CON RIP TROI ESUL ESSI RIPT TROI ESUL ON S	ERIMENTALES TROLE LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES PAR LA MODULATION TIONNELLE DE PINK1 DANS LES CELLULES ET SOURIS ALZHEIMER DUCTION TATS ON DE L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR P53 IMPLIQUE LA REGULATION IONNELLE DE PINK1 DUCTION TATS OUTION TATS DUCTION TATS JOUCTION TATS TATS TATS	. 78 . 79 . 80 . 80 . 80 . 83 . 83 . 83 . 83 . 83

Liste des figures

Figure 1 : Généralités et fonctions mitochondriales	4
Figure 2 : Ultrastructure mitochondriale	6
Figure 3 : La dynamique mitochondriale : entre fusion et fission	. 10
Figure 4 : Lien entre la dynamique mitochondriale et la mitophagie	. 11
Figure 5 : Processus mitophagique	. 13
Figure 6 : Illustration de la structure en 3 Dimensions de la protéine PINK1	. 17
Figure 7 : Protéolyse de PINK1	. 20
Figure 8 : Schéma résumant quelques fonctions de PINK1 au sein des neurones	. 22
Figure 9 : La voie PINK1/parkine /mitophagie	. 25
Figure 10 : PINK1 dans la fission/fusion mitochondriale chez les mammifères et la drosophile	. 28
Figure 11 : PINK1 et le transport mitochondrial	. 29
Figure 12 : PINK1 et la chaîne respiratoire mitochondriale	. 31
Figure 13 : PINK1 et la voie de signalisation calcique	. 32
Figure 14 : Effet anti-apoptotique de PINK1	. 34
Figure 15 : PINK1 dans le repliement et l'ubiquitination protéique	. 35
Figure 16 : Accumulation des AVs dans la MA	. 40
Figure 17 : Structure de l'APP epsilon adjacente au feuillet interne de la membrane	. 42
Figure 18 : Le traffic de l'APP	. 44
Figure 19 : Clivage de l'APP	. 45
Figure 20 : Assemblage du complexe γ-sécrétase:	. 49
Figure 21 : Clivage progressif de l'APP par les complexes γ et ε sécrétase	. 50
Figure 22 : Structure de l'AICD :	. 52
Figure 23 : Fonctions régulées par AICD	. 55
Figure 24 : Régulation de la NEP par l'AICD	. 57
Figure 25 : Schéma récapitulatif des perturbations mitochondriales décrites, dues à l'Aβ	. 60
Figure 26 : Le rôle de l'autophagie en fonction du stade de la tumeur	. 68
Figure 27 : Régulation de l'autophagie dépendante de la localisation de p53	. 72
Figure 28 : Schéma récapitulatif de la cascade moléculaire reliant les PS et PINK1	. 89
Figure 29 : Impact de la modulation de p53 sur le potentiel mitochondrial en fonction de PINK1	. 92
Figure 30 : Schéma récapitulatif de la régulation trancriptionnelle de PINK1 par p53	. 93
Figure 31 : Etude des effets d'une mutation « Hot spot » de p53 in-vivo	. 95
Figure 32 : Niveau d'expression d'ARNm de PINK1 dans plusieurs lignées cellulaires de gliomes	. 96
Figure 33 : Niveau d'expression protéique de PINK1 en fonction du grade tumoral	. 97

Préambule

Le dysfonctionnement mitochondrial est une des caractéristiques communes à l'interface entre la Maladie d'Alzheimer (MA) et le cancer. Les neurones et les cellules tumorales, de part leur haute demande énergétique, sont particulièrement dépendantes de la fonction mitochondriale notamment pour le maintien de leur homéostasie et de leur survie. La mitochondrie est une organelle hautement dynamique caractérisée par un équilibre entre sa fusion et sa fission, une motilité conséquente dans la distribution de l'énergie et une rotation des mitochondries dysfonctionnantes régulé par les processus mitophagiques. Ces caractères spécifiques sont tous essentiels pour l'intégrité mitochondriale et pour leur fonction. La mitophagie ainsi que la dynamique mitochondries. Ces deux processus sont intimement liés aux fonctions de PINK1 et ont, de ce fait, suscité mon intérêt lors de mon projet de thèse qui concerne la compréhension du rôle de PINK1 dans la MA et le cancer.

Cette introduction fournira une base bibliographique concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la qualité des mitochondries, l'altération de la dynamique mitochondriale et la mitophagie. Ces mécanismes, seront décrits dans un contexte physiologique ainsi que dans un contexte pathologique centré autour de la MA et la progression du cancer. Nous mettrons un accent particulier sur le rôle de PINK1 dans ces deux pathologies.

Introduction

I. Le contrôle qualité des mitochondries

A. Généralités sur les mitochondries

1. Historique

Le terme « mitochondrie » est composé de deux mots, d'étymologie grecque, « mitos » signifiant « filament » et « chondros » signifiant « grain ». Il a été proposé en 1898 par le docteur allemand Karl Benda, pour décrire un organite de type filamenteux. La mitochondrie a été observée pour la première fois dans les années 50, par le physiologiste Albert Von Kölliker. Entre 1850 et 1880, plusieurs scientifiques ont observé la présence des mitochondries, de manière indépendante, au sein de différents types cellulaires. Ils ont remarqué une variation des mitochondries en nombre, taille et localisation subcellulaire (Ernster and Schatz, 1981).

Plusieurs chercheurs soupçonnaient la présence de complexes enzymatiques au sein de la cellule, responsables de la transformation de l'oxygène. Dans la seconde partie du XXème siècle, l'équipe de Serrano, purifia des mitochondries d'origines bovines (Serrano et al., 1976) et rapporta les propriétés de complexes de translocation des protons adénosines triphosphates. Deux ans plus tard, la théorie de la « chémiosmose » voyait le jour, théorie selon laquelle, un flux d'ions d'hydrogène à travers un complexe enzymatique mitochondrial, fournirait l'énergie requise pour la synthèse d'Adénosine Trisphosphate (ATP), et prendrait part à l'oxydation de l'oxygène (Boyer et al., 1977; Mitchell, 1977). C'est cette théorie qui valut au scientifique anglais Peter Mitchell le prix Nobel de chimie en 1978. Une vingtaine d'années plus tard, les scientifiques Paul Boyer, John Walker et Jens Skou, montraient que le passage de protons au sein de l'ATP synthase agissant en tant que force mécanique, entrainait la rotation d'une partie des protéines, catalysant la formation d'ATP à travers la phosphorylation d'une molécule d'Adénosine Diphosphate (ADP) (Buchanan and Walker, 1996). De cette découverte en découla un nouveau prix Nobel de chimie en 1997. Depuis le développement de la microscopie électronique en 1931, il est devenu possible d'analyser et de caractériser de manière plus précise la structure microscopique des mitochondries.

2. Caractéristiques générales

La mitochondrie est un organite cytoplasmique de 1µm de diamètre environ, à double membrane présent uniquement chez les eucaryotes (Henze and Martin, 2003). Elle est retrouvée dans tous les types cellulaires mis à part les globules rouges. Chaque cellule contient 1000 à 3000 mitochondries, de formes et de tailles variables (globulaire, filamenteuse) (Wiemerslage and Lee, 2016) selon le type cellulaire. Comme les mitochondries ne peuvent être générées de novo, elles proviennent de mitochondries préexistantes suivant les processus décrits ci-dessous.

La mitochondrie contient son propre génome (1% de l'ADN cellulaire total) circulaire, bicaténaire de 16569 paires de bases, conservé lors de l'évolution. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est organisé dans le nucléoide de la matrice mitochondriale, la plus grande partie étant localisée dans les tubes mitochondriaux. Selon le type cellulaire, le nombre de copies d'ADNmt varie de 5 à 10 copies par mitochondrie, soit environ 5000 copies par cellule. Ces copies peuvent porter à la fois de l'ADNmt normal ou muté, on parle ainsi d'hétéroplasmie (Wallace, 2005). L'ADNmt, chez les mammifères, code 37 gènes qui encodent 13 protéines mitochondriales, 2 ARN ribosomaux mitochondriaux et 22 ARNs de transferts (information 10000 fois inférieure quantitativement aux informations de l'ADN nucléaire). De plus, les mitochondries peuvent contenir plus de 1000 protéines encodées directement dans le noyau qui seront transloquées, du cytosol vers la mitochondrie (Taylor et al., 2003). L'ADNmt est hérité de la mère, alors que, l'ADNmt venant du père est éliminé pendant les phases précoces de l'embryogénèse chez les eucaryotes. Les systèmes de réparation de l'ADN sont présents mais incomplets.

La mitochondrie est traditionnellement considérée comme la principale source d'énergie et de biosynthèse du métabolisme cellulaire, certains lui conférant même l'image d'une « centrale nucléaire » cellulaire. Cependant, elle possède un spectre d'actions plus etendu (*Figure 1*). Elle joue un rôle crucial dans de nombreuses voies de signalisation (McBride et al., 2006), dont parmi les plus importantes, l'apoptose, le vieillissement, l'homéostasie calcique, les fonctions de synthèse des hormones stéroidiennes ou des acides aminés non essentiels.



Figure 1 : Généralités et fonctions mitochondriales

En plus d'être une « centrale nucléaire» cellulaire, la mitochondrie régule de nombreux messagers secondaires qui eux-mêmes possèdent des cibles précises avec des impacts spécifiques dans un pannel de fonctions cellulaires.

3. Structure mitochondriale

a. Structure générale

La mitochondrie est un organite intracellulaire partagée par 2 membranes distinctes qui délimitent 5 compartiments distincts (*Figure 2*) : une matrice mitochondriale, l'espace inter-membranaire (IMS) qui sépare la membrane externe (OMM) de la membrane interne mitochondriale (IMM) et les crêtes qui représentent le compartiment généré par l'invagination de l'IMM.

b. La matrice mitochondriale

D'aspect granuleuse (granulations denses et irrégulières), la matrice mitochondriale contient des mitoribosomes (ressemblant aux ribosomes bactériens), de l'ADN circulaire (ADNmt), de l'ARNm et de l'ARNt ainsi que de nombreux systèmes enzymatiques (enzymes chargées de l'oxydation du pyruvate, de l'oxydation des acides gras et appartenant au cycle citrique de Krebs).

c. L'espace intermembranaire

L'IMS est un espace dense d'une épaisseur de 4 à 7 nm contenant des protons H+ (rôle dans la phosphorylation oxydative), des molécules de cytochrome c (cyt c) (rôle dans l'apoptose) et des molécules de plus petits poids moléculaires (<10 kDa, ions, oses, etc).

d. La membrane mitochondriale externe

L'OMM, est une bicouche lipidique de 5 à 7 nm d'épaisseur, avec une composition proche de celle de la membrane plasmique. L'OMM contient 40% à 50% de lipides et 50% à 60% de protéines dont des protéines membranaires formant des canaux : les Porines, qui permettent la diffusion libre de petits métabolites (ions et molécules de masse moléculaire inférieure à 10 kDa). L'OMM enveloppe l'organite séparant l'IMS du cytoplasme. Au départ, considéré comme une simple enceinte de confinement de la mitochondrie, de récentes études lui ont attribué des caractéristiques physiologiques et de signalisations importantes, grâce à son dialogue avec les « mitochondria-associated ER-membranes » (MAMs).

Les MAMs, participent de manière stratégique, à la propagation des signaux cellulaires incluant ceux du contrôle du métabolisme lipidique, de la mort cellulaire et de l'homéostasie du calcium (Chami et al., 2008). En effet, le calcium est nécéssaire pour les complexes enzymatiques mitochondriaux. Toutefois, les mitochondries sont de mauvais capteurs de calcium. Ceci s'explique en partie par le fait qu'elles ne possèdent qu'un seul type de transporteur de calcium (MCU) (Naon and Scorrano, 2014) de faible affinité pour le calcium. Elles importent le calcium à partir des MAMs qui sont riches en calcium, permettant ainsi de contrecarrer la faible affinité du MCU pour le calcium. Des altérations des MAM sont observées dans des modèles cellulaires de pathologies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie d'Huntington ou la maladie de Parkinson (MP).

e. La membrane mitochondriale interne

En ce qui concerne l'IMM, c'est une bicouche lipidique de 5 à 6 nm avec une organisation très différente de celle de la membrane externe. Elle est composée de 80% de protéines et 20% de lipides. Elle est riche en cardiolipine, en transporteurs et complexes enzymatiques de la chaine respiratoire, responsables de la production de l'énergie. L'IMM a une structure similaire à la membrane plasmique bactérienne. Contrairement à l'OMM, elle ne possède pas de porines. Elle est imperméable à toutes molécules extérieures. La pénétration à travers l'IMM ne peut se réaliser que via des transporteurs particuliers appelés translocases.

f. Les crêtes mitochondriales

L'IMM forme de nombreuses invaginations qui se replient dans des poches appelées crêtes. La conséquence majeure de ses invaginations est l'augmentation de la surface du complexe respiratoire afin d'amplifier de manière considérable, la capacité respiratoire de la mitochondrie. La taille et la forme des crêtes peuvent changer en fonction du signal intracellulaire. Ainsi, un remodelage des crêtes peut s'opérer suite à l'activation de la mort cellulaire programmée. Dans ce cas précis, les jonctions des crêtes s'élargissent, deviennent « perméables » au cytochrome c qui active des protéases spécifiques, les caspases qui se chargeront de l'exécution du programme de mort cellulaire. La forme des crêtes demeure importante dans la formation et la stabilité de la chaine du complexe respiratoire, en une structure quarternaire appelée surpercomplexe. Il est donc logique que l'efficacité et le bon fonctionnement de la respiration mitochondriale, en réponse aux changements du métabolisme ou du stress cellulaire, dépendent directement de la forme des crêtes. De manière intéressante, les protéines qui contrôlent l'architecture des crêtes peuvent être localisées au niveau de l'IMM ou des MAMs. Cette coopération inter-organelles permettrait de répondre aux changements du métabolisme mais reste encore peu caractérisée. La dynamique d'orchestration de l'interaction des compartiments intra- et inter-mitochondriaux demeure indispensable dans la modulation de l'activité mitochondriale.



Figure 2 : Ultrastructure mitochondriale

La mitochondrie est composée d'une double membrane délimitant un espace intermembranaire et une matrice mitochondriale. La membrane interne forme de nombreux replis appelés crêtes mitochondriales.

B. La dynamique mitochondriale

Initialement décrite comme une organelle statique, la mitochondrie est aujourd'hui considérée comme une structure extrêmement plastique et dynamique. Sa localisation et son transport à travers la cellule, représentent des mécanismes clés dans la distribution de l'énergie au sein des zones à hautes demandes énergétiques. Cette dynamique est essentielle pour répondre aux changements environnementaux de la cellule ainsi qu'aux besoins intrinsèques. Le transport des mitochondries s'effectue de manière rapide (de l'ordre du micromètre par seconde) le long du réseau de microtubules. Dans le cas de cellules neuronales, l'enrichissement en mitochondries dans les zones à forts besoins énergétiques, c'est-à-dire, au niveau des synapses, des cônes de croissance ou des nœuds de Ranvier, fait appel à un mouvement dit antérograde. Ce mouvement intervient depuis le soma vers les régions distales du neurone à l'aide d'un complexe « Mitochondrial Rho GTPase 1 » (Miro)-Glycosylphosphatidylinositol (Milton)/Kinésine. Le mouvement contraire c'est-à-dire rétrograde, s'effectue des zones distales vers le soma neurones. Il est pris en charge par le complexe Miro-Milton/Dynéine (*Figure 11*).

Tout en préservant sa motilité au sein de la cellule, la mitochondrie doit garder une morphologie précise, de manière à toujours répondre aux diverses agressions et stress subis par la cellule. Pour cela, la mitochondrie oscille continuellement entre sa fusion et sa fission, cherchant l'équilibre entre ces deux processus qui in fine, contrôlent la forme, la taille et le nombre des mitochondries sous-tendant leur bon fonctionnement. En effet, la dynamique et la structure mitochondriale sont directement corrélées aux fonctions mitochondriales incluant la conversion de l'énergie, la biosynthèse des acides aminés et des stéroïdes, la beta-oxydation (β -oxydation) des acides gras, la modulation du signal calcique et l'amplification de l'apoptose. La structure mitochondriale est donc naturellement régulée par un ensemble de protéines répondant à divers signaux cellulaires tels que la phosphorylation ou l'ubiquitination. Ces protéines pléiotropes participent au processus d'apoptose, au mouvement des mitochondries, à la signalisation calcique et à la régulation de l'autophagie. Les acteurs principaux qui interviennent dans le remodelage du réseau mitochondrial sont des protéines liées à la dynamine, de large GTPases qui participent donc à la fois à la fusion, la fission ou la tubulation des membranes (McNiven et al., 2000).

1. La fusion mitochondriale

Le processus de fusion mitochondriale (*Figure 3*) conduit à un nombre réduit de mitochondries plus larges et allongées formant un vaste réseau interconnecté. Elles participent

à la restauration et à la réparation des mitochondries. Elles requièrent la fusion entre elles des membranes externes et des membranes internes des deux mitochondries engagées dans le processus de fusion (Mishra and Chan, 2014). Elles sont catalysées par des GTPases de l'OMM et l'IMM. Deux acteurs clés ont été identifiés :

a. Mfn 1/2

Mfn1 et Mfn2 servent d'ancres dans l'OMM, par l'intermédiaire de leurs 2 domaines transmembranaires, et contiennent en leurs extrêmités N-Terminales, le domaine GTPase. Elles forment des homodimères ou des hétérodimères qui vont se lier à la mitochondrie voisine, entrainant leur fusion grâce à l'hydrolyse du GTP (Chen et al., 2003). Bien que les deux formes de Mfn partagent un taux de similarités de 81% et sont toutes les deux requises pour la fusion, elles exercent des fonctions distinctes (Eura et al., 2003; Koshiba et al., 2004). L'invalidation de Mfn1 chez la souris, induit plus de mitochondries fragmentées que l'invalidation de Mfn2 (Cosson et al., 2012). L'invalidation des deux formes est léthale, in utéro, chez la souris (Kasahara et al., 2013). En effet, le rôle majeur de Mfn1 est de contrôler l'assemblage de la mitochondrie en trans et d'induire la fusion avec Opa1. Le rôle de Mfn2 demeure plus incertain (Chen et al., 2005). Mfn2 forme des complexes permettant le rapprochement et la fusion entre le RE et la mitochondrie au niveau des MAMs. Cette cascade entraine la synthèse, le transfert des lipides, de l'énergie mitochondriale et du calcium entre les deux organelles ainsi que la mort cellulaire (dépendante du calcium). Cependant, ce rôle reste encore discuté puisque plusieurs études montrent des résultats divergents.

b. Opa1

La «dynamin-like 120 kDa protein mitochondrial» Opa1 est une GTPase, ancrée dans l'IMM où la protéine est exposée vers l'IMS (Olichon et al., 2002). Elle contient un signal de localisation mitochondrial (MTS) en extrêmité N-Terminale clivé suite à sa translocation dans la mitochondrie. Il existe huit isoformes d'Opa1 chez l'homme (Song et al., 2007) contre 4 chez la souris (Akepati et al., 2008). Opa1 est clivée et la taille de l'isoforme régit son implication dans le processus de fission et fusion. Ainsi, les formes longues favoriseront la fusion, tandis que les formes courtes, la fission (Baricault et al., 2007; Ishihara et al., 2006). Ce mécanisme permet de réguler par conséquent la balance entre fusion et fission. L'activité d'Opa1 nécessite la Mfn1 (Cipolat et al., 2004). Opa1 n'est pas seulement impliquée dans le contrôle de la dynamique mitochondriale. Elle contrôle aussi la mort cellulaire en régulant la taille et la largeur des jonctions des crêtes mitochondriales, ce qui se traduit par une altération de la libération de Cyt c (Arnoult et al., 2005).

c. Les modifications post-traductionnelles des protéines de fusion

D'autres régulations post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitination, la déubiquitination ou la dégradation, peuvent affiner la dynamique mitochondriale en ajoutant un niveau additionnel de complexité dans sa régulation. Il est important de noter que Mfn1/2 peuvent être ubiquitinées par la parkine (Chan et al., 2011; Glauser et al., 2011), ce qui impactera, comme décrit plus tard, la dynamique et l'homéostasie mitochondriale .

2. La fission mitochondriale

La fission mitochondriale (*Figure 3*) est un processus qui augmente le nombre de mitochondries, de plus petites tailles et de formes circulaires. A l'inverse de la fusion, le mécanisme de fission entraine la division d'une seule mitochondrie en deux mitochondries séparées. La fission est orchestrée par une gamme de protéines dont quelques une seront décrites ci-dessous.

a. Drp1 / Dnm1

Chez les mammifères, la fission nécessite le recrutement transitoire de la « Dynaminrelated protein » (Drp1) (Su et al., 2010a, 2010b). Drp1 qui possède également un rôle dans la fission des péroxisomes, est principalement cytosolique. Drp1 une fois transloquée au niveau de la mitochondrie oligomérisera, engendrant une structure en forme d'anneau (Mears et al., 2011; Smirnova et al., 2001). Cet anneau participe au resserrement de la structure tubulaire mitochondriale afin d'induire la fission. Ce phénomène de fission, peut être renforcé par d'autres protéines (« mitochondrial fission protein 1 » (Fis1), « mitochondrial fission factor » (Mff), « mitochondrial dynamics protéins of 49 and 51 kDa » (MiD49 et MiD51)) qui ont pour objectif de recruter Drp1 vers la mitochondrie (Losón et al., 2013).

b. Les modifications post-traductionnelles des protéines de fissions

Des régulations post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation ou la nitrosylation, peuvent également affiner la dynamique mitochondriale, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire. Ainsi, la phosphorylation de Drp1, selon l'effecteur et le résidu phosphorylé, accroit ou réduit son activation et Drp1, est ubiquitinylé par la parkine (Wang et al., 2011).



Figure 3 : La dynamique mitochondriale : entre fusion et fission

La fission produit deux mitochondries filles à partir d'une mitochondrie « parentale ». Les mitochondries sont fractionnées en plus petites tailles et plus grand nombre. Le processus de fusion de deux mitochondries en une seule est caractérisé par un nombre plus bas de mitochondries, de plus grandes tailles et allongées formant un réseau tubulaire.

3. La dynamique mitochondriale et la mitophagie

La dynamique mitochondriale et le contrôle de la qualité mitochondriale sont des processus interconnectés (*Figure 4*). Cette assertion est corroborée par l'observation d'effets délétères/létaux induits par l'invalidation de Mfn1/2, Opa1 ou Drp1 ainsi que par les maladies sévères induites par leurs mutations (Benard et al., 2007; Chen et al., 2005).

La fission mitochondriale joue un rôle important dans la mitophagie et contribuera à ce processus, notamment, en séparant les domaines endommagés des parties saines d'une mitochondrie (Buhlman et al., 2014; Twig et al., 2008) (*Figure 5*). L'augmentation de la fission et la diminution de la fusion réduit la taille des mitochondries dysfonctionnelles, entrainant leur assimilation par l'autophagosome (Buhlman et al., 2014; Twig et al., 2008). La perturbation de la fission affaiblit la mitophagie, favorisant l'accumulation des mitochondries défectueuses. La fragmentation des mitochondries, suite à leur fission, représente une étape importante et conduit vers la mitophagie tandis que l'élongation des mitochondries, suite à leur fusion, protège de la dégradation mitochondriale.



Figure 4 : Lien entre la dynamique mitochondriale et la mitophagie

La fission d'une mitochondrie permet l'isolement de la partie endommagée afin qu'elle soit détruite. La fusion de deux mitochondries permet de diluer les faibles dommages, à l'aide d'une mitochondrie saine empêchant sa dégradation par mitophagie.

C. La Mitophagie

1. Principe

L'autophagie peut mener à la destruction d'une organelle de manière spécifique (Lynch-Day and Klionsky, 2010), et ciblée. La mitophagie (Figure 5) est un mécanisme autophagique (BOX1) de dégradation spécifique de la mitochondrie (Lemasters, 2005). C'est une étape essentielle du contrôle qualité des mitochondries. L'autophagie sélective est basée sur la reconnaissance et la dégradation de cibles spécifiques dépendantes de récepteurs qui sequestrent « Light Chain 3 » (LC3) (Tanida et al., 2008).

Les principaux acteurs de la mitophagie, sont la parkine et PINK1. clé Ces protéines du processus mitophagique, intéragissent avec les récepteurs ou adaptateurs mitophagiques éliminer pour les mitochondries défectueuses comme détaillé dans les chapitres suivants.

L'autophagie

<u>BOX 1</u>

L'autophagie (ou macroautophagie) désigne la voie de catabolisme majeure des protéines et organelles endommagées. représente rénovation Elle une continuelle des réserves en nutriment qui confère une fonction de cytoprotection. Durant ce processus, la formation d'une vésicule (a) à double membrane, l'autophagosome(b), englobe/phagocyte (c) une partie du cytoplasme pour son élimination. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome, l'autolysosome (d), recycle le matériel (e) en direction du cytosol. Elle dépend de protéines échaffaudages tel que LC3 ou « Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein » (GABARAP), localisée dans les membranes des vésicules autophagiques. Par conséquent, LC3 est communément utilisée en tant que marqueur de l'induction autophagique, symbolisé par l'augmentation de la forme II clivée de LC3-I. L'élévation du niveau de base, et donc son activation, sera engendrée au cours d'un stress.



Mécanisme de l'autophagie ou macroautophagie : *l'autophagie dite* « non-sélective »



Figure 5 : Processus mitophagique

Le processus d'autophagie sélective menant à la dégradation des mitochondries, la mitophagie s'éxécute en différentes étapes. La mitochondrie endommagée est phagocytée par le «mitophagosome» pour être dégradée à la suite de la fusion du lysosome avec le «mitophagosome» devenant le «mitophagolysosome».

2. Les récepteurs mitophagiques

Durant la mitophagie, les mitochondries endommagées sont reconnues de manière sélective à l'aide de récepteurs mitophagiques exprimés dans L'OMM. Ils s'associent et recrutent les protéines autophagiques. Beaucoup de ces récepteurs possèdent un motif de liaison LC3-interacting region (LIR) (Birgisdottir et al., 2013). Ils sont caractérisés par leur capacité de liaison à la cible ou aux membranes autophagosomales. Une autre classe de protéines réceptrices, les adaptateurs autophagiques, ne se fixant pas sur LC3, servent de point d'ancrage pour la machinerie autophagique et régulent l'initiation, la conjugaison, le transport et la fusion des autophagosomes. Le signal autophagique le plus répandu chez les mammifères est l'ubiquitination de la cible. Beaucoup de récepteurs autophagiques possèdent un domaine de liaison à l'ubiquitine. L'activité des récepteurs autophagiques est fortement régulée par l'induction de leur expression, leur localisation cellulaire, et de multiples modifications post-traductionnelles afin de les maintenir à faible niveau en condition normale. Plusieurs récepteurs ont ainsi été identifiés. Certains récepteurs restent inconnus et/ou leurs mécanismes demeurent encore obscurs. De ce fait, j'illustrerai ma description par le recepteur autophagique « Sequestosome-1/ubiquitin-binding protein p62 » (p62) ainsi que son lien fonctionnel avec la voie PINK1/parkine (Figure 5, Figure 9).

3. p62/SQSTM1

C'est le premier récepteur identifié chez l'homme (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007). Initialement caractérisée comme protéine d'échafaudage, p62 participe à plusieurs voies de signalisation importantes. Elle est d'abord décrite dans les réponses traitant les défauts d'agrégrations protéiques (Pankiv et al., 2007). Un défaut dans leur dégradation conduit à la formation de corps d'inclusion contenant des protéines agrégées polyubiquitinées, une des caractéristiques typiques des pathologies neurodégénératives telles que la MA (Zatloukal et al., 2002). L'accumulation de protéines ubiquitinylées sera à l'origine de l'augmentation de p62. Les mutations de p62 perturbent la clairance autophagique des protéines ubiquitynilées et agrégées. Elle est capable de s'auto-oligomériser, un processus critique pour sa translocation dans la membrane autophagosomale. En revanche, la dégradation autophagique de p62 dans l'autophagosome, dépend de l'interaction LIR-LC3 (Pankiv et al., 2007). C'est en 2010 que l'hypothèse de sa participation dans la clairance d'une mitochondrie endommagée, la cascade majoritaire par PINK1/parkine/ubiquitine/p62SQSTM1 a été proposée (Geisler et al., 2010) et lui procurant ainsi, un potentiel rôle en tant que récepteur mitophagique (*Figure 9*).

4. La cascade PINK1/parkine /p62

La cascade PINK1/parkine/p62 représente une des voies majoritaires de l'élimination des mitochondries endommagées et à ainsi porter une attention particulière lors de mes travaux de thèse. De manière remarquable, la parkine peut compenser les effets de la perte de fonction de PINK1 tandis que PINK1 ne peut compenser celle de la parkine, suggérant que PINK1 et la parkine évoluent dans une même voie, dans laquelle, la parkine se situe en aval de PINK1 (Clark et al., 2006; Park et al., 2006). Les mutations de la parkine ou de PINK1, associées aux formes autosomales récessives de la MP, se traduisent globalement par le même phénotype clinique. L'évidence d'un mécanisme mettant en jeu PINK1 et la parkine, fut suggéré par la découverte que l'association fonctionnelle de ces deux protéines pouvait promouvoir la suppression des mitochondries endommagées conduisant à la mitophagie (Narendra et al., 2008a). C'est ainsi que mes travaux concernant essentiellement PINK1, seront détaillés dans la section lui étant dédiée.

II. PTEN INDUCED KINASE 1 : PINK1

A. Historique

Suite à l'introduction exogène du suppresseur de tumeur « phosphatase and tensin homolog mutated in multiple advanced cancers 1 » (PTEN) dans une lignée de cellules cancéreuses, l'équipe de Matsushima-Nishiu (Matsushima-Nishiu et al., 2001) met en évidence l'expression d'une protéine jusqu'alors inconnue PINK1, acronyme de PTENinduced putative kinase 1 (OMIM 608309). PINK1 a été clonée pour la première fois en 2001 (Unoki and Nakamura, 2001). Le gène codant la protéine PINK1, a été identifié en 2004, par l'équipe de Valente (Valente et al., 2004a). C'est dans une famille italienne que les premières mutations du gène de PINK1 (faux-sens ou non-sens) furent identifiées et associées à des cas autosomaux récessifs à début précoce de la maladie de Parkinson (MP) (Valente et al., 2004a, 2004b).

B. Généralités : du gène à l'activité kinase de PINK1

1. Le locus PARK6 : gène de PINK1

Grâce aux approches d'associations d'études de familles parkinsoniennes, le gène codant pour PINK1 (Ensenml ID : ENSG00000158828) a été identifié. Il se situe dans la région 3,7cM, 2,8Mb région du chromosome 1p36-p35 (le brin 1:20959948-20978004(1)). Le locus de « Parkinson disease protein » PARK6 contient 8 exons pour 1.8 kb (Valente et al., 2001).

2. Les Mutations de PINK1

Indubitablement, la découverte de mutations sur PINK1, il y a 10 ans, chez des patients présentant une forme à début précoce de MP renforce l'hypothèse du défaut mitochondrial au sein des formes génétiques et sporadiques (**BOX 2**) de la MP (Valente et al., 2004b), mais aussi de proposer une possible implication de PINK1 dans l'étiologie d'autres pathologies associées au dysfonctionnement mitochondrial comme la MA et le cancer.

Génétique de la MP : formes génétiques et formes sporadiques

BOX 2

5% des cas de syndromes Parkinsoniens sont dus à des causes purement génétiques. PINK1 a été liée aux formes monogéniques rares de MP et représente la seconde cause plus fréquente de MP juvénile précoce *(après la Parkine, à l'origine de 1% à 9% des formes précoces de MP)*.

3. L'ARNm de PINK1

a. Expression de l'ARNm de PINK1

L'ARN de PINK1 est exprimé dans tous les tissus des souris et chez l'homme avec une forte expression dans le cerveau, le cœur, les testicules et les muscles squelettiques, et une plus faible expression dans les ovaires, le thymus et le colon. La distribution de PINK1 dans le cerveau de rat et de souris est homogène incluant le cortex ou encore l'hippocampe ainsi que des zones touchées dans la MP, comme la substance noire pars compacta et le noyau caudé. (Blackinton et al., 2007; Taymans et al., 2006). Chez la drosophile, l'ARNm de PINK1 est retrouvé dans la rétine et le cerveau.

b. Régulation de l'ARNm de PINK1

L'ARNm de PINK1 est régulé par la protéine PTEN, une phosphatase suppresseur de tumeurs mutée dans plusieurs cancers. Elle régule positivement l'expression de l'ARNm de PINK1 (Unoki and Nakamura, 2001). La diminution du niveau endogène de l'ARNm de PINK1 observée dans un modèle de souris dépourvu de PTEN conforte ces résultats (Mei et al., 2009). PTEN n'étant pas un facteur de transcription, la question de la présence d'un intermédiaire doté d'une activité transcriptionnelle a donc été soulevée. De manière intéréssante, le facteur de transcription FOXO3a a été retrouvé inactivé dans le modèle de souris invalidée en PTEN (Zhou et al., 2015).

FOXO3a fait partie de la famille des facteurs de transcription FOXO, dont l'activation, protège généralement la cellule contre le stress cellulaire, notamment oxydatif en modulant l'expression de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante (Kops et al., 2002) une fonction réminiscente de celle attribuée à PINK1. L'invalidation de FOXO3a, par ARN interférence a permis de montrer une diminution du niveau d'ARNm des transcrits de PINK1. De plus, l'expression de PINK1 est induite dans des neuroblastomes (SH-SY5Y) suite, à la privation en sérum, inductrice de FOXO. Finalement le facteur de transcription FOXO3a accroît l'expression de l'ARNm de PINK et représente à ce jour le seul facteur de transcription régulant PINK1 avec plusieurs éléments de liaison identifiés sur son promoteur (Mei et al., 2009).

4. La protéine PINK1

PINK1 est transloquée dans la mitochondrie où elle sera accumulée ou renvoyée dans le cytosol. Son temps de demi-vie est faible, environ 30 minutes, en conditions basales.La dégradation de PINK1 est conditionnée par sa localisation sub-cellulaire et intervient principalement par le système protéasomal dans le cytoplasme (Muqit et al., 2006).

a. Structure protéique de PINK1

PINK1 (*Figure 6*) (Trempe and Fon, 2013) est une sérine/thréonine (et ubiquitine) kinase de 63kDa composée de 581 acides aminés . Elle possède un MTS en N-terminal (site de clivage par des peptidases entre les résidus 34 et 35) et un domaine transmembranaire (TM), important pour l'orientation de son domaine catalytique (Silvestri et al., 2005; Valente et al., 2004b; Zhou et al., 2008a). Le domaine kinase hautement conservé (résidu 156 à 509), supporte son rôle neuroprotecteur (Haque et al., 2008a) et la plupart des mutations de PINK1 entrainent la perte de son activité (Corti et al., 2011; Deas et al., 2009; Valente et al., 2004b). Les autres sous-domaines sont impliqués dans la liaison de l'ATP (sous-domaines I-IV), dans son activité catalytique (sous-domaines VIa-VII-XI), son orientation (sous-domaine II), sa stabilisation (sous-domaine VIII), sa structure et sa reconnaissance du substrat (sous-domaines IV-V).



Figure 6 : Illustration de la structure en 3 Dimensions de la protéine PINK1

D'après J.F Trempe et E. A. Fon 2013.

Les mutations homozygotes et hétérozygotes

Plus de 100 mutations homozygotes sur le gène de PINK1 ont été identifiées (Corti et al., 2011 ; Deas et al. 2009) et associées aux formes autosomales récessives de la MP dans diverses populations de différentes ethnies. La plupart des mutations hétérozygotes de PINK1 ont été retrouvées dans des patients présentant une MP tardive et rarement dans des cas de formes récessives, suggérant un possible rôle des mutations de

PINK1 comme facteur de susceptibilité (Deas et al., 2009; Gandhi et al., 2006; Klein et al., 2007; Valente et al., 2004a). Quatre mutations hétérozygotes dans des cas sporadiques de MP (A339T, Y431H, N451S, C575R) ont notamment été répertoriées.

La localisation structurale protéique des mutations de PINK1

La majorité des mutations de PINK1 (Corti et al., 2011 ; Deas et al. 2009), sont localisées sur le domaine kinase *Ser/Thr suggérant que la perte de l'activité kinase joue un rôle crucial dans l'établissement de la* pathologie MP associée à PINK1.



Structure et mutations de PINK1 : D'après Olga Corti, Suzanne Lesage, Alexis Brice 2011.

b. Répartition tissulaire de PINK1

PINK1 est exprimée de manière ubiquitaire chez l'homme, avec une expression forte dans le foie et le tissu épithélial mais également les glandes surrénales et mammaires, la prostate, le pancréas, les reins, l'estomac, les intestins, et l'hypophyse. Elle est plus faible, voire absente, dans la vessie, l'épiderme, les vaisseaux sanguins, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et le gyrus dentelé. Au niveau cérébral, elle est présente dans la substance grise, au niveau du cortex, du striatum, de l'amygdale, de l'hippocampe, du tronc cérébral et dans les neurones corticaux et cellules de Purkinje contrairement à la substance blanche et les cellules gliales (Berthier et al., 2011; Blackinton et al., 2007). Chez la souris et

le rat, PINK1 est fortement exprimée dans la substance grise contrairement à la substance blanche, dans le cortex, les neurones dopaminergiques, l'aire tegmentale ventrale, l'hippocampe, le striatum, le thalamus, l'agmydale, la substance noire et plus faiblement dans le gyrus dentelé. Elle est en revanche détectée dans la glie chez la souris, ce qui n'est pas observé chez l'homme. Une forte expression est décrite dans les tissus périphériques tels que le foie, la langue et la glande surrénale (Blackinton et al., 2007; Taymans et al., 2006).

Chez l'homme, il existe deux isoformes cérébrales majeures de 63kDa et 52kDa (Beilina et al., 2005; Weihofen et al., 2008). La forme de 52kDa, représente la forme mature obtenue à partir du clivage dans la mitochondrie de la forme de 63kDa. Une fois clivée, la forme de 52kDa est transloquée dans le cytosol où elle sera dégradée (Beilina et al., 2005; Fedorowicz et al., 2014).

c. Les modifications post-traductionnelles

i. Clivage et protéolyse de PINK1

Il a été montré que PINK1 est importée dans la mitochondrie grâce à sa séquence MTS (Valente et al., 2004a). Dans une mitochondrie saine (Figure 7), le potentiel membranaire mitochondrial conduit à la translocation de PINK1 dans l'IMM, par des systèmes de transport «translocase of outer membrane» (TOM) et «translocase of inner membrane» (TIM) (Lazarou et al., 2012), respectivement localisés au niveau de l'OMM et l'IMM. Une fois dans l'IMM, PINK1 est clivée par une série d'enzymes « Mitochondrial processing peptidase » (MPP), Les protéases « presenilins-associated rhomboide-like » (PARL) ou « mitochondrial AAA proteases» (m-AAA) et « caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit » (ClpX) dont le rôle exact de chacune reste encore indéterminé. Le clivage de PINK1 dans l'IMM par PARL, de la partie transmembranaire hydrophobe entre les acides aminés A103 et F104 du fragment de 63kDa, génére un deuxième fragment d'environ 52kDa. (Deas et al., 2009; Meissner et al., 2011; Shi et al., 2011; Greene et al., 2012). Cette coupure génère ainsi un fragment déstabilisé en N-terminal qui est transloqué de la mitochondrie vers le cytosol (Weihofen et al., 2008; Yamano and Youle, 2013). Dans le cytosol, la coupure de la forme entière de PINK1 libère le résidu phénylalanine exposé en N-terminal. Il est rapidement reconnu et dégradé par un système ubiquitine protéasome nommé E3 ubiquitine ligase UBR1, UBR2 et UBR4 (Yamano and Youle, 2013). Cette cascade est le signe de la « bonne santé » d'une mitochondrie.

Le clivage de PINK1, par les PARLs, dépend du potentiel mitochondrial (Narendra et al., 2010). En effet, une mitochondrie endommagée perd sa capacité à maintenir son potentiel transmembranaire (due à un défaut de sa chaine de transport d'électron) entrainant un blocage de la translocation de PINK1 dans l'IMM et son accumulation dans l'OMM (Jin et al., 2010). Son domaine kinase est exposé vers l'extérieur de la mitochondrie et donc potentiellement accessible pour les substrats cytosoliques (Zhou et al., 2008b). Dans l'OMM, PINK1 se lie au complexe TOM (Lazarou et al., 2012) ce qui prévient son clivage par les PARL. Une petite sous unité du complexe TOM, Tom7 contribue à l'accumulation de PINK1 dans l'OMM (Hasson et al., 2013) favorisant son autophosphorylation sur les Ser228 et Ser402 (formation d'un surpercomplexe moléculaire comprenant le complexe TOM et un dimère de PINK1 qui facilite son autophosphorylation). Cette autophosphorylation est requise pour son activité kinase qui régit la phosphorylation de l'ubiquitine et de la parkine, et le recrutement de cette dernière (Okatsu et al., 2012). Ce mécanisme explique comment PINK1 peut identifier une seule mitochondrie déficiente parmi une population complexe de mitochondries saines.



Figure 7 : Protéolyse de PINK1

Dans les mitochondries saines PINK1 est constitutivement clivée et le produit engendré est exporté dans le cytosol pour être dégradé par le protéasome. Dans les mitochondries endommagées, le potentiel mitochondrial est altéré, PINK1 s'accumule et promeut la mitophagie.

ii. L'activité kinase de PINK1 : les substrats

PINK1 est capable de phosphoryler de nombreux substrats. Parmi ceux-ci, « TNF receptor-associated protein 1 » (TRAP1) module la protection mitochondriale contre l'apoptose (Pridgeon et al., 2007). La parkine qui intervient dans les processus de mitophagie, est phosphorylée sur la Thréonine175 (Thr) ce qui induit sa translocation à la mitochondrie (comme décrit précédemment) (Narendra et al., 2008a, 2010; Shiba-Fukushima et al., 2014; Vives-Bauza et al., 2010). La protéine Miro est directement phosphorylée par PINK1, sur la Ser156 (Ser) et la Thr299, qui régule par cet intermédiaire, le trafic mitochondrial (Kane and Youle, 2011; Weihofen et al., 2009). PINK1 est aussi capable de moduler la phosphorylation d'un autre régulateur de l'homéostasie mitochondriale « 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2a/omi » Htra2/Omi (Plun-Favreau et al., 2007). De manière synthétique, on peut dire que PINK1 module, par l'intermédiaire du statut de phosphorylation de ses substrats intervenant dans une série de cascade de signalisation, diverses voies cellulaires impliquées dans le contrôle de processus importants incluant la réponse autophagique.

iii. L'autophosphorylation de PINK1

Une autre caractéristique de PINK1 est sa capacité à autoréguler son activité kinase. En effet, PINK1 peut s'autophosphoryler sur de multiples résidus. L'autophosphorylation de PINK1 est un processus d'auto-activation et donc, d'activité de sa fonction kinase. Cette observation a été mise à profit pour augmenter artificiellement la stabilité, et donc l'activité de PINK1. En effet, le traitement au carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP) augmente son activité de phosphorylation (Aerts et al., 2015).

Une autre protéine « the microtubule affinity-regulating kinase 2 » (MARK2) peut également phosphoryler PINK1 sur la Thr313, et réguler son activité. Les conséquences fonctionnelles de cette phosphorylation sont le contrôle du trafic des mitochondries au sein des neurones. (Matenia and Mandelkow, 2014; Matenia et al., 2012).

C. Les différentes fonctions de PINK1

La plupart des fonctions de PINK1 (*Figure 8*), sont liées à son activité kinase comme le suggère la localisation de la mutation « perte de fonctions » qui se situent sur son domaine catalytique (**BOX 3**) (Corti et al., 2011 ; Deas et al. 2009; Marongiu et al., 2009). De plus, beaucoup de celles-ci sont directement ou indirectement associées à la mitochondrie comme l'indique sa fonction primaire dans l'homéostasie mitochondriale.



Figure 8 : Schéma résumant quelques fonctions de PINK1 au sein des neurones

Valente 2009 (Future Neurology 4(5):575-590). PINK1 possède un panel de fonction allant de la maintenance de la santé mitochondriale, à la dynamique mitochondriale, le trafic mitochondrial, la respiration mitochondrial, l'homéostasie calcique, une fonction anti-apoptotique, uen fonction dans la voie de repliement des protéines jusqu'à la transmission synaptique.

1. PINK1: un senseur et contrôleur de la santé mitochondriale.

de

PINK1 agit comme un senseur de la santé mitochondriale en surveillant en continu son statut. Elle supprime les mitochondries endommagées du réseau mitochondrial de la cellule

via une forme macroautophagie sélective.

Ce procédé est directement dépendant de la localisation (transport) et de la dynamique mitochondriale, deux processus associés aux fonctions de PINK1 (Chan, 2012; Yang et al., 2008b).

De ce fait, la mitochondrie endommagée sera fragmentée suite à la baisse de son potentiel mitochondrial et éliminée par les composants de la machinerie autophagique/ lysosomale. Les mitochondries endommagées sont dégradées au niveau du soma, loin des zones en demande forte d'énergie. En conditions normales, la mitophagie est inhibée par le fragment PINK1 cytosolique qui s'associe à la parkine (Kitada et al., 1998) conduisant ce complexe néoformé à dégradation sa (Fedorowicz et al., 2014).

En condition de stress (*Figure 9*), la dépolarisation des

La Parkine

BOX 4a

Généralités

La parkine est une E3 ubiquitine ligase possédant une activité de facteur de transcription (Alves Da Costa et al., 2009, Alves Da Costa and Checler, 2010). Elle est associée aux formes autosomales récessives de la MP. La parkine contrôle *l'homéostasie protéique et mitochondriale grâce à « l'étiquetage »* ubiquitine de ses cibles, les conduisants vers la voie UPS (une voie majeure de dégradation des protéines par le protéasome et dans la voie autophagique.

Conformation protéique

La parkine appartient à la famille des protéines à doigts de zinc (Winklhofer, 2014). Elles sont composées d'un domaine UBL (Ubiquitin like domain), trois domaines RING (Really Interesting New) RING0, RING1, RING2 et un autre domaine se liant au zinc, le domaine IBR (In between ring), associés de manière RING1-RING(IBR)-RING2. Le domaine RING1 contient un site de liaison pour l'E2 ubiquitine ligase et le domaine RING2 porte le site catalytique impliquant le résidu cystéine (C431). Le domaine RINGO constitue le domaine d'interaction avec PINK1 (Xiong et al., 2009). Le domaine UBL possède une structure similaire à l'ubiquitine, ainsi qu'un élément répresseur (REP). Ces derniers bloquent les sites de liaison et catalytique. Ainsi, la parkine doit obligatoirement changer de conformation pour être active. L'activation de la parkine permet la mono- ou poly-ubiquitination de ces substrats (Iguchi et al., 2013; Lazarou et al., 2013; Spratt et al., 2014; Walden and Martinez-Torres, 2012; Wenzel et al., 2011).



Structure 3D de la parkine: D'après K.F. Winklhofer 2014.

mitochondries entraine l'activation de PINK1 qui s'accumule dans l'OMM (Jin et al., 2010).

Elle phosphoryle l'ubiquitine sur la Ser65 (S65) et recrute et active plusieurs protéines de l'OMM dont la parkine (**BOX 4a**) (Kondapalli et al., 2012; Koyano et al., 2014; Okatsu et al., 2015; Shiba-Fukushima et al., 2014). Après son activation, la parkine ubiquitine d'autres protéines de l'OMM qui constitueront de nouveaux substrats pour la phosphorylation de

La Parkine

PINK1 (Chen and Dorn, 2013)

BOX 4b

la nécessaires pour reconnaissance, le recrutement et nouvelles l'activation de molécules de parkines. C'est ainsi que la parkine régule notamment la Mfn2 (Chen and Dorn, 2013). La parkine se fixe à Mfn2 de manière dépendante de PINK1, qui phosphoryle Mfn2 et renforce, de la sorte, l'activité ubiquitine de la parkine (Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010; Ziviani et al., 2010). La mise en place de cette boucle renforce et accélère la translocation de la parkine ainsi que la destruction de la mitochondrie endommagée. En plus d'ubiquitinyler les protéines de l'OMM, la parkine catalyse la formation de deux chaines de poly-ubiquitines lysine 27 (K27) et lysine 63 (K63) qui sont toutes les deux importantes pour la mitophagie (Sha et al., 2010; Shiba-Fukushima et al.,

Recrutement et activation de la parkine par PINK1

La parkine présente une haute affinité pour l'ubiquitine phosphorylée sur la sérine 65 (S65/pS65-Ub) et se fixe à cette dernière. Cette fixation entraine son recrutement du cytosol vers l'OMM (Koyano et al., 2014; Okatsu et al., 2015; Shiba-Fukushima et al., 2014). Cette liaison entre pS65-Ub et le domaine RING0 (residue K151), RING1 (residue H302 et R305) et RING (IBR) (residue Y312) constitue la poche « pS65-Ubbinding pocket (Kazlauskaite et al., 2015; Wauer et al., 2015; Yamano et al., 2015). Elle entraine de manière structurale le déplacement des domaines inhibiteurs UBL et REP, levant l'autoinhibition de la parkine.Ce changement de conformation, en une nouvlle configuration est dite « ouverte» (Caulfield et al., 2015). De plus, ce déplacement du domaine UBL permet sa phosphorylation sur la Ser65, par PINK1 (Zheng and Hunter, 2014) qui stabilise cette configuration « ouverte » et renforce la liaison parkine et pS65-Ub (Kumar et al., 2015). De cette manière, le domaine RING1 devient accessible aux liaisons avec des enzymes E2 rendant la cystéine du domaine catalytique de RING2, vulnérable à la formation de thioester ubiquitine et son action d'ubiquitination.



2014). La parkine poly-ubiquitine de multiples protéines qui vont être reconnues et regroupées grâce au récepteur p62 (Geisler et al., 2010). De cette manière, p62 devient capable de se coupler préférentiellement à K63, et ainsi, d'associer K63 et « Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 » (VDAC1) pour induire la mitophagie (Geisler
et al., 2010). VDAC1 est l'une des protéines les plus abondantes de l'OMM. C'est un composant du « mitochondrial permeability transition pore » (mPTP) qui évolue au sein de l'apoptose. De plus, le recrutement et l'activation de la parkine augmentent le nombre de protéines de l'OMM ubiquitinylées favorisant la cascade d'engloutissement de l'organite par l'autophagosome. Les mutants « pertes de fonction » de l'activité ubiquitine ligase de la parkine bloquent la translocation de la parkine au sein des mitochondries suite à l'accumulation de PINK1. Ceci souligne le rôle crucial de l'activité ubiquitine ligase de la parkine pour son propre recrutement par PINK1.

Bien que le dialogue parkine/PINK1 soit essentiel au processus mitophagique, PINK1 peut aussi induire la mitophagie indépendamment de la parkine (Lazarou et al., 2015).



Figure 9 : La voie PINK1/parkine /mitophagie

La mitophagie peut être menée par plusieurs voies : le schéma ici représente la voie mitophagique dépendante de PINK1/parkine /p62 contre la voie mitophagique indépendante de la parkine ou de p62. PINK1 et parkine à travers la phosphorylation et l'ubiquitination de protéines de l'OMM recrutent des récepteurs mitophagiques qui initieront la mitophagie et la dégradation de la mitochondrie endommagée. PINK1 sans la parkine peut phosphoryler directement des protéines ou des ubiquitines de l'OMM entrainant le recrutement de la machinerie mitophagique. Les cellules dans lesquelles PINK1 est réduite, montrent une augmentation du nombre d'autophagosomes avec une localisation des mitochondries près de l'aire péri-nucléaire (une aire importante pour la dégradation mitophagique) (Chu, 2010a, 2010b; Dagda et al., 2009). Ces résultats soulignent un défaut de dégradation autophagique ou une compensation de la perte de PINK1, par l'activation de voies autophagiques protectrices, dans le but de se débarrasser des mitochondries endommagées et accumulées. En parallèle, il a été montré que PINK1, interagissait physiquement avec « coiled-coil, moesin-like Bcl-2 interacting protein » (Beclin-1/BCN1), une protéine d'initiation de la formation des autophagosomes (Michiorri et al., 2010), renforçant le lien de PINK1 avec l'autophagie.

2. PINK1 et la dynamique mitochondriale

La fission ou la fusion mitochondriale sont des procédés de modelage/remodelage de la mitochondrie qui contrôlent à la fois la morphologie, le nombre, la dynamique, la distribution et la structure du réseau mitochondrial (Chan, 2012; Twig et al., 2008; Yang et al., 2008b). Elles sont nécessaires pour le fonctionnement de la mitochondrie permettant de répondre au statut énergétique de la cellule et au maintien d'une population de mitochondries saines. La fusion de plusieurs mitochondries, permet de partager le contenu mitochondrial (protéines, métabolites, substrats et autres) dans le but de compenser les déficiences individuelles et de maintenir une population de mitochondries comportant une fonction optimale (Westermann, 2008). La fission permettra l'isolement des parties mitochondriales endommagées afin de faciliter leurs éliminations.

De nombreux articles proposent un rôle de PINK1 dans la régulation de la dynamique entre fission et fusion mitochondriale (Deng et al., 2008; Park et al., 2009; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008b). Cependant, définir PINK1 comme une protéine pro-fission ou pro-fusion est encore sujet à discussion. La plupart des arguments expérimentaux concernent l'analyse directe de la morphologie mitochondriale des cellules.

Chez la drosophile exprimant un ARN interférant dirigé contre PINK1 ou exprimant une forme mutante de PINK1, on observe une altération de la morphologie mitochondriale. Les mitochondries sont gonflées, s'élargissent et s'agrègent dans les tissus à forte demande énergétique tels que les tissus moteurs ou les neurones dopaminergiques (Park et al., 2006; Wang et al., 2006a; Yang et al., 2006). Ce phénotype est restauré suite à la surexpression du gène de fission Drp1 ou l'invalidation du gène de fusion Opa1 (Morais et al., 2009; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008b). De plus, la voie PINK1/parkine induit directement la dégradation d'un gène de fusion Mfn entrainant la fragmentation des mitochondries (Poole et al., 2008; Ziviani et al., 2010). Ces résultats suggèrent un effet « pro-fission » de PINK1, tout du moins dans ce modèle biologique.

Contrairement à ce modèle, dans les cellules de mammifères, PINK1 est décrit plutôt comme un facteur de pro-fusion, puisque dans des modèles de réduction ou de perte de fonctions de PINK1 (utilisation d'ARN interférents dirigés contre PINK1, des cellules souches humaines dopaminergiques portant une mutation sur la protéine PINK1, des cellules HeLa ou des modèles plus relevants de fibroblastes dérivés de patients portant une mutation de PINK associée à la MP), on observe une augmentation de la fragmentation des mitochondries (Lutz et al., 2009; Sandebring et al., 2009) avec une diminution du potentiel mitochondrial ainsi qu'une morphologie anormale.

Cette différence phénotypique soulève beaucoup de questions, et la réponse semble résider dans la dépendance du type cellulaire et de l'organisme examiné. La question de la relevance de cette variabilité d'un point de vue pathologique reste en suspens.

Cette apparente discordance a été étudiée en comparant des modèles invalidés pour PINK1 et des modèles d'invalidation pour les protéines de la machinerie de fusion/fission. Comme décrit ci-dessus, chez les mammifères (Figure 10), PINK1 semble avoir un effet profusion (Exner et al., 2007; Wood-Kaczmar et al., 2008). Le modèle d'invalidation de PINK1 devrait donc se traduire par un phénotype identique à cellui des modèles invalidés pour les protéines induisant la fusion. Ainsi l'invalidation de Mfn1 ou Mfn2 conduit à une sévère fragmentation des mitochondries (Chen and Chan, 2005; Chen et al., 2003) alors que l'invalidation de Drp1 (Ishihara et al., 2009), devrait entraîner un phénotype de fusion. Clairement, la délétion de Drp1 ou l'utilisation d'un dominant négatif de Drp1 restaure que partiellement le phénotype anormal observé dans des cellules invalidées en PINK1. Il ne restaure pas l'excès de production des « Reactive oxygen species » (ROS), renforçant donc un effet pro-fusion de PINK1. Cependant, une autre étude a établi une augmentation de la taille des mitochondries dans des souris invalidées en PINK1 (Gautier et al., 2008) en accord avec l'agrégation et la fragmentation des mitochondries observée après surexpression de PINK1 dans des cellules de mammifères (Yu et al., 2011). De plus, il a également été décrit que l'induction de PINK1 ainsi que de la parkine favorisaient la dégradation de Mfn1/2 (Glauser et al., 2011; Ziviani and Whitworth, 2010). Ces résultats infirment à priori le concept selon lequel PINK1 controllerait exclusivement les processus de fusion et montre que le débat concernant l'impact de PINK1 sur la dynamique mitochondrial n'est pas clos.

Le lien fonctionnel PINK1-parkine est aussi plus complexe que généralement admis puisque la perte de fonction de la parkine est suffisante pour induire les phénotypes mitochondriaux, même dans des cellules invalidées en PINK1 (Deng et al., 2008). Ces résultats complexifient la compréhension du rôle de la parkine dans ces processus.



<u>Figure 10</u> : PINK1 dans la fission/fusion mitochondriale chez les mammifères et la drosophile

D'après Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW 2009.

3. Le trafic mitochondrial

Un des autres aspects essentiels dans l'homéostasie mitochondriale réside dans le transport des mitochondries (*Figure 11*). En effet, la régulation de la distribution mitochondriale devient cruciale dans les cellules neuronales, qui sont de grandes cellules fortement arborisées. Elles nécessitent de forts besoins énergétiques spécifiquement dans des zones synaptiques ou au niveau des cônes de croissances neuronaux (Hollenbeck and Saxton, 2005). PINK1 forme un complexe avec Miro de l'OMM et Milton une protéine adaptatrice du cytosol (Weihofen et al., 2009). Ce complexe prend en charge l'attache de la mitochondrie avec les microtubules (Boldogh et al., 2005; Yaffe et al., 2003) via l'interaction entre Milton (Glater et al., 2006) et la kinésine I ou la dyneine. Le transport mitochondrial prend une place importante dans le contrôle qualité des mitochondries puisque le transport antérograde permet

d'apporter de nouvelles mitochondries saines et donc de renouveler le stock de mitochondries au niveau des zones à forte demande, alors que le mouvement rétrograde rapatrie les mitochondries endommagées ou dysfonctionnantes vers le soma neuronal (Weihofen et al., 2009), où elles sont dégradées et recyclées. La régulation de PINK1, permet la modulation indirecte du transport mitochondrial. PINK1 à travers la régulation de ce transport, peut directement impacter la dynamique de la mitochondrie. La phosphorylation de Miro par PINK1 entraine le recrutement de la parkine sur Miro qui, après phosphorylation et activation, ubiquitine Miro (mais également des protéines de la dynamique mitochondriale comme Mfn1/2) menant à sa dégradation, bloquant ainsi la motilité, le transport axonal et la dynamique de la mitochondrie avant sa dégradation par la mitophagie (Shlevkov et al., 2016).



Figure 11 : PINK1 et le transport mitochondrial

Quand le potentiel mitochondrial est diminué ($\Delta \Psi m$), PINK1 bloque le transport mitochondrial rétrograde (vers le soma) ou antérograde (vers la synapse) par l'intermédiaire de la parkine, grâce à la phosphorylation et l'ubiquitination du complexe Miro/Milton, orientant la mitochondrie vers sa mitophagie.

4. La respiration mitochondriale

La production d'énergie au sein de la mitochondrie intervient par les supercomplexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans laquelle des électrons traversent la membrane en échange de molécules d'ATP et de ROS. On estime environ que 1-5% de l'oxygène consommé est converti en ROS. Les ROS sont produits naturellement par le métabolisme oxygénique et possèdent un rôle physiologique. Ils peuvent ainsi réguler le système immunitaire ou encore certaines voies cellulaires. Lorsque le niveau de ROS dépasse la

capacité de la cellule et que cette dernière ne parvient plus à éliminer le surplus, des dommages apparaissent sur l'ADN, les protéines et les lipides. Des dysfonctions de la fonction des mitochondries sont observées soit avec l'âge, soit lors de stress chez la souris. De manière intéressante, PINK1 forme un complexe protéique avec les complexes I-IV de la chaîne respiratoire (Liu et al., 2009). Des défauts de l'activité des supercomplexes mitochondriaux sont rapportés dans différents modèles d'invalidations ou de mutations pertes de fonctions de PINK1 (*Figure 12*) (souris invalidées, neurones et fibroblastes dérivés de souris déficientes en PINK1, fibroblastes dérivés de patients comportant une mutation sur PINK1, fractions de cerveaux et de foie enrichies en mitochondries de souris ou de patients ; drosophiles exprimant une mutation de PINK1 ou invalidée en PINK1 par ARN interférant) (Gautier et al., 2008; Gispert et al., 2009; Marongiu et al., 2009; Morais et al., 2009, 2014) convergeant pour la plupart vers un phénotype caractérisé par:

- un défaut et une diminution de l'activité des surpercomplexes respiratoires,
- une accumulation de ROS et du stress oxydatif,
- une diminution de l'activité respiratoire et donc de production d'ATP,
- une diminution de la consommation en oxygène,
- une altération du potentiel mitochondrial ($\Delta \Psi m$)

La conjonction de ces altérations impacte l'alimentation en énergie de la cellule, la dégradation via le protéasome, ou la consommation d'oxygène causant l'ouverture pathologique du pore mitochondrial (Abramov et al., 2011; Gandhi et al., 2009; Gautier et al., 2012; Gegg et al., 2009; Grünewald et al., 2009; Hoepken et al., 2007; Morais et al., 2009; Wood-Kaczmar et al., 2008). Récemment, le niveau de régulation du complexe I mitochondrial par PINK1 a été établi par Morais et al. qui ont démontré que la sous-unité NdufA10 est phosphorylée sur sa Ser250 et que cette régulation est nécessaire pour réguler l'activité de réduction de l'ubiquinone du complexe 1 qui semble être indépendante de la mitophagie (Morais et al., 2014)



<u>Figure 12</u> : PINK1 et la chaîne respiratoire mitochondriale D'après Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW 2009.

5. La voie de signalisation calcique

La déficience en PINK1 entraine un défaut d'entrée du calcium (Gandhi et al., 2009), qui se traduit par une accumulation du calcium dans la matrice mitochondriale et une réduction significative de son niveau cytosolique dans les neurones des patients déficients en PINK1 (Marongiu et al., 2009). Les souris invalidées en PINK1, âgées de deux mois, montrent aussi un déficit de la capacité de stockage du calcium (Akundi et al., 2011; Gautier et al., 2012). Cette accumulation stimule la production de ROS. L'augmentation des ROS engendre l'inhibition du transporteur de glucose, qui par conséquent, réduit la libération de substrats, entrainant un défaut de respiration mitochondriale, une déstabilisation de la perméabilité du pore mitochondrial suivie d'une dépolarisation de la mitochondrie et une libération de facteurs pro-apoptotiques menant in fine à la mort cellulaire. Le phénotype décrit précédemment dans les modèles déficients en PINK1 ou exprimant des formes de PINK1 mutées, associées à la MP est restauré par le blocage spécifique de l'accumulation du calcium mitochondrial (Marongiu et al., 2009) suggérant un rôle de PINK1 dans le stockage du calcium, les mutations de PINK entrainant l'induction d'une surcharge calcique mitochondriale dans les neuroblastomes SH-SY5Y. De plus, un arrêt du mouvement mitochondrial lié à une augmentation du calcium intra-cellulaire a été observé dans plusieurs lignées cellulaires (Cai and Sheng, 2009). La régulation de la motilité mitochondriale dépend du calcium, et un des rôles clés de la mitochondrie est de capter et stocker le calcium, prévenant ainsi cette surcharge calcique. PINK1 en se fixant au complexe Miro-Milton, devient capable de réguler le flux de calcium mitochondrial (Wang and Schwarz, 2009). L'hypothèse selon laquelle, PINK1 serait responsable du processus de transport et de stockage du calcium mitochondrial semble donc avèrée.



Figure 13 : PINK1 et la voie de signalisation calcique

D'après Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW 2009.

6. La fonction anti-apoptotique de PINK1

La voie mitochondriale peut contribuer à la mort cellulaire (*Figure 14*). Elle est initiée par la perméabilisation de l'OMM due à une ouverture anormale du pore mitochondrial, entrainant la libération dans le cytosol de plusieurs facteurs apoptotiques (Ribe et al., 2008) et du Cytochrome c. Dans le cytosol, le cyt c forme des complexes avec les protéases apoptotiques telles que la pro-caspase 9 entrainant son activation ainsi que celles de caspases exécutrices (Slee et al., 1999; Li et al., 1997; Zou et al., 1997).

L'implication de PINK1 dans la prévention de l'induction de cette apoptose neuronale dépendante des caspases et du cyt c (Petit et al., 2005), est liée à l'identification des premiers cas de MP suite à l'exposition accidentelle au 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

(MPTP). L'effet inhibiteur du complexe I induit par le MPTP (Langston and Ballard, 1983; Langston et al., 1983), fût corrélé avec une augmentation des marqueurs de dommages liés au stress oxydatif, dans la substance noire pars compacta (Dawson and Dawson, 2003; Dexter et al., 1989a, 1989b). De façon similaire, les neurones dopaminergiques issus de souris invalidées en PINK1, présentent aussi une sensibilité accrue à la mort cellulaire induite par la roténone ou le MPTP (Haque et al., 2008a).

Chez la drosophile, les mutants de PINK1, ou son invalidation par ARN interférant, ont une espérance de vie réduite (Park et al., 2006) et des niveaux de parkine également diminués (Wang et al., 2006a; Yang et al., 2006). Dans des modèles cellulaires, la surexpression d'une forme sauvage de PINK1 protège la cellule contre l'apoptose induite par le MPTP ou le N-[(2S)-4-méthyl-1-[[(2S)-4-méthyl-1-[[(2S)-4-méthyl-1-coxopentan-2-yl]amino]-1oxopentan-2-yl] amino]-1-oxopentan-2-yle]carbamate de benzyle (MG-132) en bloquant la libération du cyt c et son activation de la pro-caspase 3 (Mills et al., 2008; Wang et al., 2007).

Inversement, la surexpression d'une forme de PINK1 mutée sur son activité kinase, associée à la MP, réduit la viabilité cellulaire. Il été proposé que l'effet protecteur de PINK1 pouvait résulter de son interaction avec ses substrats, et par conséquent, de la phosphorylation de la parkine, de TRAP1, Htra2/omi ou par l'activation indirecte de « nuclear factor-kappa B » (NF- κ B), un facteur de transcription des gènes de survie (Esteves et al., 2010; Gaki and Papavassiliou, 2014).

Il a également été montré que la neuroprotection pouvait-être médiée par la forme cytosolique de PINK1. Ainsi, la protéine PINK1, dépourvue de son MTS et de son TM, pouvait protéger la souris de la toxicité du MPTP (Haque et al., 2008b). Cette observation suggère une activité protectrice de PINK1 indépendante de la mitophagie, puisque PINK1 ne peut pas induire la mitophagie quand elle est localisée dans le cytosol (voir ci-dessus) (Geisler et al., 2010; Narendra et al., 2010).



Figure 14 : Effet anti-apoptotique de PINK1 D'après Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW.

7. L'ubiquitination et le repliement protéique.

Le repliement et l'ubiquitination protéique sont importants dans la mort neuronale caractéristique de la plupart des pathologies neurodégénératives. Les études menées sur les agrégats présents dans la MP, les corps de Lewy, ont permis d'identifier comme composant principal l'alpha-synucléine (Spillantini et al., 1997), l'ubiquitine (Kuzuhara et al.) et des protéines chaperonnes qui aident au repliement des protéines (Gai et al., 2000).

De manière intéressante, PINK1 ainsi que des mitochondries, sont retrouvées séquestrées dans des inclusions, ressemblant aux agrésomes, suite à l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome dans des cellules surexprimant PINK1 (Muqit et al., 2006). Cette localisation de PINK1 est aussi décrite dans les corps de Lewy d'un modèle de souris, présentant une machinerie protéasomale rendue défectueuse par modification génétique (Bedford et al., 2008a, 2008b) et renforçant une participation éventuelle de PINK1 au sein de cette fonction.

En effet, PINK1 est capable d'interagir avec plusieurs protéines chaperonnes qui en retour peuvent affecter la distribution subcellulaire, la stabilité et le clivage de PINK1 et donc sa fonction de kinase neuroprotectrice (Moriwaki et al., 2008; Weihofen et al., 2008) (*Fiqure* <u>15</u>). De plus, PINK1 contrôle la phosphorylation de nombreuses protéases mitochondriales impliquées dans la dégradation des protéines mal repliées et leur accumulation. PINK1 joue donc un rôle direct dans le système UPS dont le fonctionnement dépend de l'ATP et de son lien fonctionnel avec la parkine. PINK1, en formant un complexe avec la parkine et la « protein déglycase» (DJ-1)(Plun-Favreau et al., 2007), participe à la dégradation des protéines mal repliées. La mutation de ces trois protéines, mènera donc à l'accumulation de protéines anormales.



Figure 15 : PINK1 dans le repliement et l'ubiquitination protéique.

D'après Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW.

8. La transmission synaptique.

L'étude en neuroimagerie fonctionnelle de patients MP portant des mutations de PINK1 a conduit un rôle de PINK1 dans le maintien des fonctions normales et de survie des terminaisons dopaminergiques. Des dysfonctions de la voie dopaminergique nigrostriatale comparables à celles observées dans les formes sporadiques à début tardif ont été rapportées. Ces dysfonctions sont également présentes dans un modèle de drosophile exprimant une mutation « perte de fonction » de PINK1 (Park et al., 2006), qui manifeste des problèmes moteurs au niveau des muscles des ailes accompagnés de la dégénérescence des neurones dopaminergiques (l'inactivation de PINK1 par l'intermédiaire d'un ARN interférent entraine le même phénotype) (Wang et al., 2006; Yang et al., 2006).

Par la suite, des études neuroanatomiques de souris dépourvues de PINK1 n'ont établi aucune anormalité dans la morphologie, la densité des cellules dopaminergiques, le nombre de neurones dopaminergiques dans la substance noire pars compacta, et montré un niveau striatal normal de tyrosine hydroxylase, de dopamine et ses métabolites (Gautier et al., 2008; Kitada et al., 2007). Ceci suggère une synthèse et un renouvellement normal de dopamine indépendant de PINK1.

Néanmoins, deux autres études montrent une réduction de 25% du niveau de dopamine dans le striatum de souris invalidées pour PINK1 à des âges de 6, 9, 12 et 22 mois (Akundi et al., 2011; Gispert et al., 2009). Ainsi, le modèle de souris invalidé en PINK1 présente une activité motrice réduite de l'animal en fonction du vieillissement qui est accompagnée d'une réduction du niveau total de dopamine cérébral (Gispert et al., 2009). Des enregistrements neurophysiologiques révèlent une réduction de la libération de dopamine et des défauts de la potentialisation à long terme (LTP) ainsi que de la dépression à long terme (LTD) qui peuvent être restaurés par des agonistes des récepteurs dopaminergiques ou des agents qui augmentent la libération de dopamine comme la Levodopa (L-dopa) (Kitada et al., 2007).

Ces résultats révèlent un rôle critique de PINK1, dans la libération de dopamine et la plasticité synaptique au niveau du striatum et du circuit nigrostriatal, et suggèrent que l'altération de la physiologie dopaminergique peut précéder la dégénérescence. De plus, le modèle montre une augmentation de la sensibilité des récepteurs métabotropiques de groupe 2 du glutamate, dans le striatum, de manière similaire aux modèles de MP induits par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) chez le rat ou déficients en parkine. En effet ces récepteurs

présynaptiques modulent les efférences corticostriatales des terminaisons glutamatergiques qui sont connues pour interagir fonctionnellement avec les voies dopaminergiques nigrostriées. Cette augmentation de la sensibilité peut reflèter un changement adaptatif en réponse à une altération du métabolisme dopaminergique (Komendantov et al., 2004; Madeo et al., 2016; Martella et al., 2009).

9. La régulation du cycle cellulaire

Une nouvelle fonction de PINK1 dans la modulation du cycle cellulaire émerge depuis quelques années. Rappelons dans un premier temps, que PINK1 est régulée positivement par PTEN (Unoki and Nakamura, 2001), qui est directement impliqué dans les grandes voies de survie de la cellule. De nouvelles études ont décrit un rôle de PINK1 au sein de la régulation du cycle cellulaire. PINK1 agirait comme un régulateur positif de la progression du cycle cellulaire, via sa capacité de régulation de la dynamique mitochondriale (O'Flanagan and O'Neill, 2014). De plus, le cycle cellulaire et le contrôle qualité des mitochondries sont intimement liés. C'est ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires la délétion de PINK1 réduit la prolifération en bloquant la cellule avant sa division (O'Flanagan et al., 2015).

III. Les défauts mitochondriaux et l'implication de PINK1 dans la Maladie d'Alzheimer.

La mitochondrie est un organite fondamental pour la cellule et il n'est pas étonnant que sa dysfonction se traduise par des pathologies sévères, et notamment cérébrales, puisque comme discuté plus haut, le cerveau est particulièrement « gourmand » en énergie. Ce défaut mitochondrial commun à différentes maladies neurodégénératives, notamment la MP et la MA nous a conduit à nous intéresser au rôle de PINK1 dans la MA (**BOX 5**).

A. La Mitochondrie au cœur du développement de la MA

1. Les défauts mitochondriaux dans la MA : Description macroscopique

Une des caractéristiques majeures de la MA est une agrégation protéique excessive toxique, reflétant un défaut des systèmes de dégradation mis en place par la cellule. L'autophagie est une des voies majeures de la dégradation des protéines. Il n'est donc pas illogique que celle-ci soit impliquée dans l'agrégation des protéines caractéristiques de la MA. L'observation de cerveaux MA a permis de décrire la présence d'une désorganisation et d'un gonflement des neurites, précédent leur dégénérescence. Ce phénotype a été associé à une accumulation massive de vacuoles autophagosomales dans leur soma (Baloyannis, 2006; Moreira et al., 2007a, 2007b; Trushina et al., 2012) jusqu'à en devenir le principal organite de la structure (*Figure 16*).

Généralitées sur la MA

<u>BOX 5</u>

En France, actuellement, la MA concerne près de 900000 personnes malades, soit l'équivalent de la ville de Marseille. Les estimations sont inquiétantes puisque d'ici 8 ans, la France comptera 1275000 malades (source France Alzheimer), ce qui en fait la cause la plus fréquente de démence chez l'être humain. La MA est caractérisée par une perte progressive neuronale qui entraine une diminution progressive et irréversible des fonctions mentales et de la mémoire. Au niveau histopathologique deux types de lésion son décrites. Les dégénéréscences neurofibrillaires qui sont des lésions intracellulaires composées de protéines Tau hyperphosphorylées et les dépôts amyloides ou plaques séniles, qui quand à eux, sont des amas protéiques extracellulaires composés majoritaiement de peptides amyloides β (A β).



Plaques amiloïdes et dégénérescences neurofibrillaire : D'après Rob O'Brien, Brandon Tavshanjian

De manière concomitante, les gènes d'induction de l'autophagie sont transcriptionnellements activés dans les cerveaux de patients MA, contrairement à l'inhibition des régulateurs négatifs de l'autophagie.

Il est important de noter que l'inhibition de la voie de dégradation lysosomale dans des souris sauvages, entraine des neuropathologies caractéristiques des modèles de souris MA, et exacerbe la pathologie autophagique ou amyloide dans les modèles de souris MA. Une accumulation de LC3 et des vacuoles autophagiques est retrouvée lors de l'inhibition de protéolyse la lysosomale mais également lors de l'induction de l'autophagie par la rapamycine. Le même phénotype est observé lorsque les cathepsines, enzymes de dégradation lysosomale, sont inhibées ou délétées (Ralph A. Nixon et al., 2001). Ces données renforcent l'hypothèse qu'une perte de la fonction autophagique principalement par le biais de l'innéficacité du système lysosomal dans la dégradation des AVs participe à la progression de la MA.

De plus, les mitochondries de cerveaux MA présentent de multiples anomalies structurelles et fonctionnelles, notamment de la morphologie mitochondriale, illustrée par une taille réduite et une désorganisation des crêtes mitochondriales (Baloyannis, 2006; Hirai et al., 2001), des défauts de fonction et du métabolisme, une dynamique et un transport mitochondrial altérés, une augmentation des mutations de l'ADNmt (Reddy, 2011), et une augmentation du stress oxydatif (Hauptmann et al., 2009; Reddy, 2009).

Dans la littérature, très peu de données concernent la mitophagie dans la MA. Le premier signe d'un défaut mitophagique dans la MA a été rapporté par l'équipe de Hirai en 2001 montrant un niveau élevé des composants mitochondriaux dans le cytoplasme neuronal (Hirai et al., 2001) suggérant une augmentation de la dégradation autophagique des mitochondries (Moreira et al., 2007a, 2007b). De plus, les niveaux élevés de stress oxydatif décrits dans la MA peuvent perturber l'induction des caspases et inactiver la mitophagie ou perturber les voies de clairance des mitochondries (Andreux et al., 2013; Chen and Chan, 2009).

Les défauts de transports mitochondriaux signent aussi les pathologies neurodégénératives. Une réduction du transport mitochondrial axonal est observée dans les neurones corticaux des cerveaux MA et les cellules hybrides cytoplasmiques (cybrids) MA (Cardoso et al., 2004; Swerdlow et al., 2014). Les cerveaux MA montrent une accumulation aberrante de mitochondries défectueuses dans les régions distales neuronales, due, à un défaut de leur trafic qui bloque les mitochondries endommagées dans le soma ce qui se traduit par un défaut de clairance autophagique et un mauvais contrôle de la qualité des mitochondries.

La fission/fusion mitochondriale contribue aussi au trafic anormal décrit dans la MA. Une réduction des niveaux de Mfn 1 et 2 est observée dans les hippocampes de sujet MA. (Wang et al., 2008a) (Mfn1 et 2 interagissent avec le complexe miro-milton et kinésine 1 régulant le transport mitochondrial). L'altération du niveau de Mfn2 entraine une altération du mouvement mitochondrial et du transport des organelles. Une réduction du niveau de Drp1, ainsi que des mitochondries allongées, sont aussi décrites dans certains modèles expérimentaux de MA. La localisation de Drp1 dans la mitochondrie dépend de l'actine. Celle-ci est altérée dans la MA, perturbant l'association physique de la mitochondrie avec Drp1, menant à l'élongation des mitochondries et leur mauvaise localisation). De plus, la protéine « Glycogen synthase kinase 3 beta » (GSK3 β) phosphoryle Drp1, ce qui se traduit par une élongation des mitochondries et une inhibition de la fission ainsi que la distribution mitochondriale (Chou et al., 2012).

De récentes études montrent que la voie PINK1/parkine/mitophagie est induite dans les neurones de souris MA et des patients MA (Batlevi and La Spada, 2011; Palikaras and Tavernarakis, 2012). Cette induction est corrélée avec l'accumulation de mitochondries défectueuses dans les neurones MA et peut être reliée à l'incapacité d'élimination des AVs. L'hypothèse d'un déficit lysosomal impliqué dans la MA menant à l'accumulation de substrats non-protéolysés corrobore l'accumulation de « mitophagosomes ». Elle renforce l'idée d'un déficit d'élimination et d'un défaut du renouvellement des « mitophagosomes », mettant en évidence un défaut à la fois de la voie autophagique générale et sélective.



Figure 16 : Accumulation des AVs dans la MA

D'après Nixon R.A. 2007. Ce schéma représente l'accumulation progressive des AVs lors du développement de la MA. (A) Autophagie normale et dégradation des AVs. (B) Défaut de la voie de dégradation des AVs. (C) Défaut de dégradation des AVs établis, entrainant l'accumulation des AVs ainsi que de leur contenu, provoquant ainsi le gonflement du neurone le menant à sa dégénérescence.

2. La cascade amyloïde et dysfonctionnement mitochondrial dans la MA

La cascade amyloide est au cœur de l'étiologie de la MA et pourrait être affilié au dysfonctionnement mitochondrial décrit précédemment. Les pages suivantes détailleront l'implication de la cascade amyloide dans les origines des anomalies mitochondriales observées dans la MA.

a. La cascade amyloïde

i. Généralités

En 1984, Glenner and Wong purifient et séquence le peptide amyloïde (A β) à partir de prélèvements sanguins (Glenner and Wong, 1984) et de parenchyme (Masters et al., 1985a, 1985b) ainsi que de cerveaux atteints de MA. Ce travail séminal a conduit à l'identification de la séquence du gène de la protéine précurseur de l'amyloïde, la β APP (Kang et al., 1987). Plus tard, la caractérisation des coupures intervenant sur la β APP et l'identification des protéases impliquées (De Strooper and Annaert, 2000), ainsi que la mise en évidence de mutations autosomales dominantes responsables de formes génétiques de MA sur la β APP, ont permis de placer le peptide A β au sein d'une cascade appelée cascade amyloïde se situantt en amont du développement des dégénèréscences neurofibrillaires et du processus de mort cellulaire retrouvées au cours de la MA.

b. La βAPP : la protéine précurseur du peptide Aβ

i. La biologie de la β APP

La β APP (*Figure 17*) est un membre de la famille des protéines membranaires de type 1, qui inclut l'APLP1 et l'APLP2 (Yoshikai et al., 1990). Son gène se trouve sur le chromosome 21 et contient 19 exons. Durant son transport du RE vers la membrane plasmique, l'APP est modifiée de manière post-traductionnelle, par N- ou O-glycosylations, par phosphorylation ou sulfation. La forme mature glycolysée de l'APP est délivrée du réseau trans-golgien vers la membrane plasmique, où elle est très vite protéolysée (Georgopoulou et al., 2001).

L'ARNm de la β APP subit un épissage alternatif et peut générer 8 variants. Il existe 3 isoformes majeures : APP695, APP751, et APP770. APP770 et APP751 contiennent un domaine inhibiteur de protéases à sérine « Kunitz protease inhibitory » (KPI) (Kitaguchi et al., 1988; Tanzi et al., 1988), mais également un extra domaine 0X-2. L'APP695 exclut

l'exon 7 (KPI) et l'exon 8 (OX2-homolgy domain) (*Figure 17*). Bien que la β APP soit une protéine exprimée de manière ubiquitaire, la forme APP695 est majoritaire dans le cerveau et notamment dans les neurones (Sandbrink et al., 1994), alors que les formes APP751 et APP770 sont peu abondantes dans le cerveau et majoritairement au niveau des cellules gliales (Kitaguchi et al., 1988; Tanzi et al., 1988). L'expression de l'APP695 est décelable très tôt lors de l'embryogénèse chez le rat et la souris. Dans la MA, il a été reporté une augmentation de la β APP contenant le domaine KPI.



Figure 17 : Structure de l'APP epsilon adjacente au feuillet interne de la membrane

D'après Suh Y.H. et Checler F. 2002 Le panel supérieur représente les produits de clivages obtenus par les voies amyloïdes ou non amyloïdes. Le panel inférieur représente la structure de l'APP epsilon avec ses différents domaines et ses clivages donnant le peptide amyloïde. La structure du peptide amyloïde est également représentée dans le panel du milieu.

La/les fonction(s) de la β APP reste(nt) encore incertaine(s) (Müller and Zheng, 2012). Des rôles potentiels dans le trafic cellulaire, les signalisations neurotrophiques, l'adhésion cellulaire, et la signalisation cellulaire ont été proposés (Hoareau et al., 2008). Cette incertitude est en partie due au fait que, chez les mammifères, la β APP et ses congénères

APLP1 et APLP2 partagent certaines fonctions et peuvent donc se complémenter. Ainsi, alors que les souris invalidées en APP sont viables et fertiles avec seulement des défauts mineurs, dont, une réduction du poids, et de l'activité locomotrice (Senechal et al., 2008; Yang et al., 2005) la double invalidation des formes APP et APLP1 sont viables tandis que la double invalidation des formes APP et APLP2, entraine la mort après la naissance, soulignant une redondance fonctionnelle entre ces différents membres (von Koch et al., 1997; Weyer et al., 2014).

ii. La localisation et le trafic de la β APP

La β APP est synthétisée (*Figure 18*) dans le réticulum endoplasmique et emprunte les voies de sécrétion constitutive, d'endocytose et de recyclage dans le soma neuronal (Busciglio et al., 1993; Haass et al., 2012). La β APP est détectée dans le RE, les compartiments intermédiaires RE-AG (ERGIC), au sein de tous les compartiments du AG, la membrane plasmique (Hansson et al., 2005; Kaether et al., 2002), les endosomes (Gupta-Rossi et al., 2004; Kaech and Banker, 2006; Kaether et al., 2006a), les lysosomes (Meckler and Checler, 2014; Zeitelhofer et al., 2009) et les autophagosomes. Elle est également présente dans la mitochondrie (Manczak et al., 2006), le noyau et même le cytoplasme. Les fragments issus du clivage de la β APP sont également présents.

L'altération du trafic intracellulaire et de la localisation de la β APP impactent directement la protéolyse d'APP et la production du peptide A β (Greenfield et al., 2002).



Figure 18 : Le traffic de l'APP

Après sa biosynthèse et sa maturation dans le RE, la β APP peut être clivée dans l'AG par les β et γ -sécrétases. Elle peut être sécrétée vers la membrane plasmique où elle subira un autre clivage par l'a sécrétase. Elle peut également être endocytosée à travers le réseau endosomal où elle subira le clivage β et γ . Elle sera, soit dégradée dans les lysosomes, soit transportée de manière rétropgrade au niveau du AG ou recyclée vers la membrane plasmique. De l'APP à également été identifié dans la mitochondrie.

iii. Les mutations de l'APP

Les mutations de 18 des acides aminés de la β APP sont responsables de formes familiales de MA. La plupart représentent des mutations autosomales dominantes d'un seul acide aminé, et plus de 30 mutations pathogéniques sont décrites. Seulement une des mutations actuellement connues a été rapportée comme protectrice contre la MA (Jonsson et al., 2012).

De nombreuses mutations associées à la MA affectent de manière directe la protéolyse de la β APP, en augmentant la production du peptide A β , en favorisant la génèse d'une forme longue de peptide amyloïde (42 aa) présentant des propriétés d'aggrégation exacerbées. (Citron et al., 1992; Zhou and Wang, 2011).

iv. La protéolyse de l'APP

la β APP est le précurseur du peptide A β qui s'accumule dans des dépôts extracellulaires diffus (plaques diffuses ou amorphes) ou compacts (plaques séniles) et produit par la voie amyloidogène (Bohm et al., 2015) (*Figure 19*).



Figure 19 : Clivage de l'APP

La voie amyloidogène mène à la formation de l'Aß représenté par le clivage séquentiel par la ß sécrétase et la γ sécrétase. La voie non amyloidogène empêche la formation de l'Aß suite au clivage séquentiel de l'APP par l'a sécrétase puis la γ sécrétase. Dans les deux cas l'AICD est produit mais peut également être protéolysé par les caspases (les caspases peuvent protéolyser directement C99 ou APP).

La voie non amyloidogène

La voie non amyloidogène correspond à la voie majeure du clivage de la β APP dans la cellule au niveau de la membrane plasmique. Elle est initiée par l'alpha sécrétase (α sécrétase), qui clive le domaine A β et prévient sa formation. En condition physiologique, la β APP subit un premier clivage par l' α sécrétase, une métalloprotéase de la famille des « A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein » (ADAMs). Plusieurs membres de cette famille possèdent une activité α sécrétase, ADAM17, ADAM10 et ADAM9. C'est

une protéine transmembranaire qui permet le clivage de l'APP principalement au niveau de la membrane plasmique, libérant un fragment sécrété N-terminal de 100kDa (sAPP α) (Endres and Fahrenholz, 2011; Esch et al., 1990; Hotoda et al., 2002; Lichtenthaler, 2011) . Ce fragment joue un rôle important dans la plasticité et la survie neuronale et protège de l'excitotoxicité (Furukawa et al., 1996; Mattson, 1997). Il peut réguler la prolifération des cellules souches neuronales et le développement précoce du SNC (Caillé et al., 2004; Ohsawa et al., 1999). Son expression seule, restaure les déficts présents dans les souris invalidées en APP (Ring et al., 2007). La partie C-terminale reste ancrée dans la membrane est le fragment de 10 kDa C83 ou CTFalpha (CTF α). Ce fragment est par la suite, coupé par la γ -sécrétase (décrit ci-dessous), libérant un fragment soluble P3 extracellulaire et un fragment soluble intracellulaire « APP Intra Cellular Domain » l'AICD.

La voie amyloidogène

L'activité béta sécrétase

La première étape de la production du peptide amyloïde est le clivage au site beta (β). L'APP est internalisée dans les endosomes précoces, où elle va être clivée dans son domaine luminal/extracellulaire par la β -sécrétase libérant un fragment soluble sAPP β , ainsi qu'un fragment de 99 résidus, C99/CTFbeta associé à la membrane et contenant le peptide A β (CTF β). L'activité β sécrétase est portée par l'aspartyle protéase transmembranaire de type I BACE1 (le nom le plus communément utilisé), qui est distribuée principalement dans les endosomes (Capell et al., 2000; Vassar et al., 1999; Walter et al., 2001) où le fragment CTF β est généré (Grbovic et al., 2003; Mathews et al., 2002) ainsi que dans l'AG (von Arnim et al., 2006). Le sAPP β diffère du sAPP α , puisqu'il n'est pas neuroprotecteur mais pourrait, à l'inverse, produire une mort neuronale. Le fragment CTF β /C99 subit ensuite une coupure γ qui libère les peptides A β 40 ou A β 42 et l'AICD.

L'activité gamma sécrétase

Le complexe γ -sécrétase est composé de 4 protéines transmembranaires incluant une sous-unité catalytique portée par les présénilines 1 ou 2 (Chau et al., 2012; De Strooper, 2003; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995), et 3 autres protéines (Edbauer et al., 2003;

Verdile et al., 2000) impliqués dans la stabilisation du complexe et la liaison du substrat, « Anterior pahrynx defective 1 » (APH-1) (Francis et al., 2002; Goutte et al., 2002), Nicastrine (NCT) (Yu et al., 2000), et » Presenilin enhancer 2 » (PEN-2) (Francis et al., 2002). Ce complexe présente un domaine hydrophobe transmembranaire où se trouve le site catalytique. De fortes évidences montrent que le complexe se situe principalement au niveau du RE, AG, dans les compartiments intermédiaires endocytiques qui ne correspondent pas à la localisation majeure de la β APP. Les autres composants du complexe, NCT, APH-1 et PEN-2, sont également présents dans l'IMM. Il faut signaler que la β APP mitochondriale se trouve uniquement au niveau de l'OMM, ce qui semble obérer la possibilité d'une coupure γ -sécrétase de la βΑΡΡ la mitochondrie dans (Anandatheerthavarada et al.. 2003). L'activité catalytique des

Les PS : le cœur de l'activité γ sécrétase BOX 6

Les PS1 et 2 sont les deux enzymes qui constituent le coeur catalytique du complexe y secretase (Wolfe et al., 1999). Elles sont codées par deux gènes sur les chromosomes 14 (PSEN1) et sur le chromosome 1 (PSEN2). Elles possèdent une homologie *de séquence de 67%. Elles sont d'abord traduites sous formes de* précurseurs de 9 domaines transmembranaires avant de subir, dans le RE (Kaether et al., 2004), un clivage endoprotéolytique (Thinakaran et al., 1996) engendrant deux fragments N-Terminal et C-Terminal (NTF et CTF) respectivement de 28-30 et 18-20kDa (Capell et al., 2005; Kim et al., 2004). Ensemble ces deux fragments forment un complexe hétérodimérique biologiquement stable et fonctionnel (Capell et al., 1998). Les mutations associées à la MA, qui préviennent son endoprotéolyse abolissent la production d'Aß. Dans le cerveau, l'expression de PS1 est majoritaire. Elles sont rapidement dégradées après ubiquitinylation par le protéasome (Marambaud et al., 1997, 1998). Les mutations de ces deux gènes, et particulièrement de PS1, représentent la cause majoritaire des cas familiaux de MA. Les PS présentent des propriétés remarquables de protéines chaperones capables d'intéragir avec de nombreuses protéines, et notamment avec le peptide $A\beta$ et la protéine Notch. En plus de leur fonction enzymatique, les PS possèdent plusieurs fonctions annexes propres dont le contrôle du cycle cellulaire, de la signalisation calcique, de la neurotransmission glutamatergique, de l'excitation cellulaire, de la LTP, de la différenciation cellulaire, de la maturation synaptique, de l'adhésion cellulaire et surtout de l'apoptose.



PS (**<u>BOX 6</u>**) conditionne la longueur du peptide A β . La coupure γ -sécrétase, régie par l'épaisseur de la membrane, l'A β 40 ou l'A β 42 conjointement, avec le peptide AICD. (*Figure*

20) Le premier partenaire du complexe identifié, la NCT, est une glycoprotéine transmembranaire de type I considérée comme protéine d'échafaudage du complexe. Une étude montre que la NCT se lie à la βAPP et à Notch pour les recruter à l'intérieur du complexe γ -sécrétase, servant de récepteur pour la γ -sécrétase. Les deux autres composants APH-1 et PEN-2 ont été découverts par une étude de criblage dans le modèle de nématode caenorhabditis elegans. APH-1 interagit avec la NCT pour former un intermédiaire stable dans les assemblages précoces du complexe. PEN-2 intervient à la fin de la génèse du complexe en régulant l'endoprotéolyse des PS et transforme donc un complexe biologiquement inerte en une enzyme fonctionnel. Chacun de ses éléments du complexe est nécessaire pour l'activité du complexe. C'est ainsi que la coexpression des quatre composants chez la levure est nécessaire et suffisante pour reconstituer l'activité y sécrétase qui est absente de la levure. La taille du complexe de 220 kDa prédit une stœchiométrie de 1 :1 :1 :1 (Kimberly et al., 2003; Sato et al., 2007; Takasugi et al., 2003). La composition des complexes y-sécrétase (6 compositions théoriques du complexe chez l'homme) peuvent conditionner une localisation sub-cellulaire expliquant une spécificité envers leurs substrats (Meckler and Checler 2016). (Baulac et al., 2003; Edbauer et al., 2003; Herreman et al., 2003; Kaether et al., 2006b; St George-Hyslop and Fraser, 2012). De même, il apparait que la production d'A β par les complexes incluant la PS1 est plus importante qu'avec les complexes « PS2 ». (Czech et al., 2000; Palacino et al., 2000). L'activité γ-sécrétase de PS1 et PS2 est aussi impactée différemment par les inhibiteurs γ-sécrétase (Wolfe, 2012; Wolfe et al., 1999). Ces variations pourraient expliquer la différence d'impact de l'invalidation de PS1 chez la souris qui entraine une létalité embryonnaire alors que l'invalidation de PS2 chez la souris est viable et n'entraine qu'un phénotype mineur (Donoviel et al., 1999) avec une activité ysécrétase préservée (Jarrett et al., 1993; Wilson et al., 2002).



Figure 20 : Assemblage du complexe γ-sécrétase:

La NCT et l'APH-1 forment un premier complexe (1+2) rejoint par PS (1+2+3) qui sera activé suite à son endoprotéolyse réalisée par Pen-2 (1+2+3+4).

Par ailleurs, il existe plusieurs facteurs/protéines capables de se lier au complexe γ et d'influencer son activité. TMP21 diminue la production d'A β suite à l'inhibition du clivage γ (Chen et al., 2006). Une sélectivité des substrats peut également opérer par la compartimentalisation de la γ et de ses substrats. Un des problèmes majeurs de la γ sécrétase pour la mise en place de stratégies thérapeutiques, provient de son substratome, dans lequel réside un grand nombre de protéines essentielles et vitales. La γ -sécrétase clive plus de 92 substrats (Haapasalo and Kovacs, 2011; McCarthy et al., 2009), lui procurant un rôle dans divers processus cellulaires importants. L'administration d'inhibiteurs de son activité catalytique, dans le but de diminuer la production d'A β 42, entraine souvent des effets secondaires tels que la toxicité gastro-intestinale, l'interférence avec la maturation des lymphocytes B ou T associée à un défaut de signalisation et de protéolyse de Notch (De Strooper, 2014; Doody et al., 2013). Malgré cela, les espoirs persistent. Certaines drogues diminuent de manière sélective le niveau d'A β 42 sans pour autant affecter les niveaux et la production d'AICD ou de « Notch IntraCellular Domain » (NICD)(Petit et al., 2001).

c. Les Métabolites de la βAPP

i. Le peptide $A\beta$

Il existe plusieurs sites de clivage de la β APP par la γ -sécrétase générant de multiples fragments apparentés (*Figure 21*). Le peptide A β peut être libéré sous forme longue (A β 48/49) ou forme courte (A β 40) (Checler, 1995). A la suite des coupures primaires, d'autres coupures secondaires peuvent cibler le peptide et produire plusieurs espèces de tailles inférieures disposant de propriétés différentes. Les clivages C-terminaux s'effectuent selon une séquence ordonnée bien précise (A β 48/45/42/38)/(A β 49/46/43/40/37). Dans la pathologie, le rapport entre les formes A β 42 et A β 40 augmente. Le caractère agrégant du A β 42 menant à son accumulation au niveau extracellulaire et intracellulaire et son augmentation dans les formes familiales de MA a conduit à postuler son implication dans l'étiologie de la maladie (Selkoe and Hardy, 2016).



Figure 21 : Clivage progressif de l'APP par les complexes γ et ε sécrétase

D'après Selkoe D.J. et Hardy J. 2016. Représentation schématique des différents clivages γ et ε dans la formation de la forme du peptide A β 40 ou A β 42.

La majorité du peptide Aβ est sécrétée hors de la cellule, et peut être générée dans divers compartiments subcellulaires comme le RE, l'AG, et les endosomes/lysosomes (Chyung and Selkoe, 2003; Thinakaran and Koo, 2008; Zeitelhofer et al., 2009). Le peptide

Aβ intraneuronal est retrouvé dans l'hippocampe et le cortex enthorinal. L'accumulation intracellulaire de peptide Aβ, précède la formation des plaques extracellulaires et le niveau intracellulaire d'Aβ diminue quand la formation des plaques extracellulaires augmente. Cette relation inverse pourrait s'expliquer par le fait que le peptide Aβ extracellulaire pourrait être internalisé par la cellule pour sa dégradation (LaFerla et al., 2007; Oddo et al., 2006; Ohyagi, 2008; Cuello, 2005). Il faut noter que le peptide amyloïde est un produit physiologique de protéolyse de la βAPP et que sa production n'est donc pas systématiquement associée à la pathologie. Il joue d'ailleurs un rôle important dans la survie neuronale, dans le stress et l'hyperexcitabilité membranaire. Des niveaux réduits de peptide Aβ favoriseront la LTP hippocampale et les capacités de mémoires, indiquant un rôle positif dans la neurotransmission et la mémoire mais également la mort cellulaire (Kamenetz et al., 2003;).

ii. La dégradation du peptide Aβ

Dans le cerveau, les niveaux de peptide Aß dépendent d'un équilibre entre sa production et sa dégradation. Dans des conditions physiologiques, il est rapidement dégradé par plusieurs mécanismes, résultant en un temps de demi-vie de quelques heures (1,2-5h) (Cirrito and Holtzman, 2003; Savage et al., 1998). Il peut être exporté hors du cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique (Kang et al., 2000; Shibata et al., 2000) et retourner dans le cerveau par la circulation sanguine (Deane et al., 2003). Dans le plasma, il est transporté dans le foie et les reins, où il est dégradé de manière systémique (Jalkute et al., 2013; Wang et al., 2006b). Il peut être phagocyté par la migroglie suite à sa dégradation lysosomale. La dégradation du peptide Aß in-vivo est prise en charge par plusieurs protéases dont la surexpression ou la délétion altère ses niveaux cérébraux chez la souris (Eckman and Eckman, 2005; McGowan et al., 2005). La plupart d'entres elles sont des métalloprotéases qui diffèrent entre elles dans leur localisation, leur distribution, ou leur sites de coupures. La neprilysine (NEP) représente la peptidase majeure de dégradation de l'Aß (Higuchi et al., 2016; Russo et al., 2005; Barker et al., 1989;). Son invalidation entraine une augmentation des niveaux d'A β . Une voie majeure de dégradation de l'A β , la voie autophagique-lysosomale (Peric and Annaert, 2015), implique la cathepsine B. Dans les lysosomes, la cathepsine B dégrade le peptide Aß et spécialement les formes agrégées de Aβ42. La délétion de la cathepsine B entraine une augmentation du niveau de A β 42 et des plaques dans les souris exprimant des mutations associées à la MA PS1/APP, alors que la délivrance par un virus, de cette enzyme entraine l'effet opposé (Hook et al., 2009; Sun et al., 2008).

iii. Les motifs essentiels de l'APP

Plusieurs motifs ont été décrits comme ayant une relevance fonctionnelle importante. Les séquences 653YTSI, 667VTPEER, 681GYENPTY ont été identifiées sur l'APP695 (Zheng and Koo, 2006; Borg et al., 1996; Zhang et al., 1997) (*Figure 17*; *Figure 22*). Le motif VTPEER, et la Thr668 est le site majeur de phosphorylation de l'APP. Le site Tyr682 est également essentiel pour la fonction de la β APP dans les processus développementaux. En ce qui concerne la séquence GYENPTY qui peut être hosphorylé, cet état de phosphorylation ppouvant être directement associé à la MA. D'ailleur, la Tyr 757 (ou 682 de l'APP695) est fortement phosphorylée dans la MA (Russo et al., 2001) et la mutation de la Tyr757 favorise le clivage au site α plutôt qu'au site β . De plus, la protéolyse d'APP, est connue pour modifier l'intéractome de l'APP. Par exemple, les phosphorylations de la Thr743 ou Tyr682 inhibent la liaison de Fe65 sur l'APP (Minopoli et al., 2001). Le motif YENPTY, inclut égaelment le motif NPXY, il sert de signal d'internalisation des protéines membranaires et d'interaction avec des protéines adaptatrices contenant un domaine de liaison phosphotyrosine (PTB) (Uhlik et al., 2005). Beaucoup de protéines interagissant avec les formes CTFs de la β APP, possèdent un domaine de liaison PTB comme Fe65.

iv. Le domaine intra-cellulaire de la β APP : l'AICD

La γ -sécrétase génère le peptide A β et sa contrepartie C-terminale, APP Intracellular Domain (AICD) (*Figure 22*) (Gu et al., 2001; Passer et al., 2000) similaire au fragment NICD formé lar l'hydrolyse de Notch par la γ -sécrétase. (Artavanis-Tsakonas et al., 1995; Kopan, 2002). Son importance a longtemps été sous-estimée, vraisemblablement du fait de son instabilité rendant son étude difficile. Malgré cela, un réseau d'évidences indique des fonctions putatives, pouvant rendre compte de plusieurs stigmates de la MA.



Figure 22 : Structure de l'AICD :

D'après Marcus O.W. Grimm 2013.

v. La production de l'AICD

Initialement nommé AID, l'équipe de d'Adamio fût la première à montrer que le clivage sur le site γ de l'APP produisait en plus du peptide A β , un fragment additionnel C-Terminal (CTF) (Passer et al., 2000) ce qui a été confirmé par d'autres équipes, montrant que ce nouveau clivage avait lieu dans le cytosol, près de la membrane interne (Gu et al., 2001; Weidemann et al., 2002). L'espèce principalement détectée, correspond à la séquence du CTF 50-99, l'AICD50 (Yu et al., 2001; Lu et al., 2000). D'autres clivages alternatifs produisent des formes de différentes tailles comme l'AICD48/51 (Yu et al., 2001) ou l'AICD59 et l'AICD57 suite au clivage epsilon (ɛ) par l'epsilon sécrétase (ɛ sécrétase). Finalement le peptide AICD peut être clivé par des caspases libérant un fragment C31 (Lu et al., 2000). Il a d'abord été postulé que l'AICD et l'Aß étaient produits en quantité équimolaire à partir du fragment C99/CTF_β sous l'action de la γ-sécrétase (Kakuda et al., 2006). Cependant, plusieurs études ont suggèré la présence de deux activités γ -sécrétase et ε sécrétase distinctes, puisque certaines mutations sur les PS entrainent des effets opposés en augmentant la production de peptide Aβ tout en réduisant celle d'AICD (Chen et al., 2002). Corroborant cette hypothèse, des études ont montré que certaines mutations de la ßAPP augmentent la production d'AB, sans affecter la production d'AICD. Dans ce sens, une étude montre que « l'Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1 » (Fe65), une protéine se liant à AICD, entraine l'augmentation de la production d'AICD tout en diminuant celle du peptide A β 42 (Wiley et al., 2007).

Depuis, il à été mis en évidence, que le clivage de l' α sécrétase sur la β APP entraine également la libération d'AICD à partir du fragment C-Terminal C83/CTF α (Suh and Checler, 2002). C'est ainsi que les deux voies amyloidogéniques ou non amyloidogéniques produisent toutes les deux de l'AICD avec une production majeure d'AICD par la voie amyloidogénique (Belyaev et al., 2010; Goodger et al., 2009).

vi. La protéolyse de l'AICD

Durant l'apoptose, les caspases (principalement la caspase-3) peuvent directement couper la queue cytoplasmique de l'APP pour libérer un fragment C31 contenant les derniers 31 amino acides (Lu et al., 2000) potentiellement toxique mais encore débattue (Dumanchin-Njock et al., 2001). Les caspases peuvent également protéolyser l'AICD produit par les deux voies amyloïde et non amyloïde. (*Figure 19*; *Figure 22*). L'AICD est très rapidement

dégradé notamment par « l'insulin-degrading enzyme » (IDE) une métalloprotéase cytoplasmique (Edbauer et al., 2002).

vii. Les fonctions d'AICD

AICD, à été décrit comme un facteur de transcription (Cao and Südhof, 2001). Cette fonction nécessite la liaison d'un cofacteur Fe65 qui a été identifié comme étant la protéine majeure se liant avec l'AICD. L'interaction avec Tip60 sur le site PTB1 de Fe65 crée un complexe trimérique AFT (AICD/Fe65/Tip60) qui constitue le complexe transcriptionnellement actif. Fe65 augmente la stabilité de l'AICD (Kimberly et al., 2001), dont son temps de demi-vie est estimé à 5min (Cupers et al., 2001a, 2001b) du fait de sa dégradation rapide dans le cytosol par IDE (Edbauer et al., 2002), le protéasome (Nunan et al., 2001) et la cathepsine B (Asai et al., 2011; Vingtdeux et al., 2007). Le phénotype des souris délétée en Fe65, est le même que celui des animaux invalidés pour les 3 isoformes d'APP (Guénette et al., 1996). Tip60 est une histone acétyl-transférase ayant un rôle dans le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN, la transcription et l'apoptose. Fe65 se lie à l'AICD libéré par le clivage γ -sécrétase, et le complexe Fe65/AICD est transloqué dans le noyau, où il s'associe avec Tip60 pour former le complexe AFT (Goodger et al., 2009; Konietzko et al., 2010; Rotz et al., 2004).

L'AICD module la mort cellulaire (régulation de p53), l'homéostasie intracellulaire du calcium et de l'ATP (Hamid et al., 2007), le réseau neuronal (Vogt et al., 2011), le trafic cellulaire, la dynamique du cytosquelette et la GSK3 β (Ghosal et al., 2009) qui contribue à la phosphorylation de Tau (Grimm et al., 2013) ou les protéines de dégradation de l'A β comme la NEP (Pardossi-Piquard et al., 2005)



Figure 23 : Fonctions régulées par AICD

D'après Marcus O.W. Grimm 2013, En rouge les fonctions qui pourraient contribuer à la MA ; en vert, la fonction potentiellement protectrice. Ainsi la protéolyse de l'APP conduira à la production d'AICD et de A β . L'AICD peut réguler l'APP et la β sécrétase et donc sa production ainsi que celle de A β , des processus apoptotique via sa régulation de p53, la phosphorylation de Tau via la GSK3 β mais également la dégradation du A β à travers la régulation de son enzyme de dégradation majeure la NEP.

viii. Le clivage de l'APP en AICD transcriptionnellement actif ou inactif

La production d'AICD ne conduit pas systématiquement à une activation transcriptionnelle. L'AICD est principalement formé à partir de la β APP695, isoforme majoritairement exprimée dans les neurones (Belyaev et al., 2010). Seule la surexpression d'APP695 résulte en une augmentation des niveaux d'AICD dans le noyau.

La génération d'AICD dérive de la voie amyloidogène et non amyloidogénique (Kume et al., 2004). La voie amyloïdogène est responsable de la génération majoritaire de l'AICD, transcriptionnellement, dans les compartiments endosomaux (Passer et al., 2000). En effet, la surexpression du fragment C99/CTF β génère des niveaux plus élevés d'AICD que la surexpression de C83/CTF α . De plus, le blocage de l'endocytose ou de BACE1 réduit la translocation de l'AICD dans le noyau, alors que l'inhibition de l' α sécrétase n'a pas d'effet sur la génération de ce complexe (Goodger et al., 2009). L'inhibition de l' α sécrétase, ne modifie pas l'activité transcriptionnelle d'AICD. En effet, l'AICD généré par la voie non amyloidogénique est très vite dégradée dans le cytosol. La β sécrétase pourrait entraîner une

translocation au noyau de l'AICD favorisée par la proximité des endosomes et du noyau, minimisant la dégradation du peptide.

L'activité transcriptionnelle de l'AICD, est directement dépendante du type cellulaire, de l'hétérogénéité clonale, de la densité et de l'âge des cellules, ainsi que des modèles transgéniques de souris utilisés (Belyaev et al., 2009, 2010; Nalivaeva and Turner, 2013; Flammang et al., 2012). Ce qui se traduit par des réserves d'AICD, dans certains tissus et sur la régulation de la NEP (Grimm et al., 2013) (*Figure 24*). D'autres hypothèses ont également été émises concernant la liaison d'éléments comme HDAC1, capable de remodeler la chromatine par l'acétylation/déacétylation des histones. L'expression de la NEP dans les cellules neuronales est réprimée par l'intermédiaire d'une liaison compétitive de HDAC sur son promoteur. L'inhibition pharmacologique de l'histone désacétylase (HDAC), restaure, ainsi, la liaison de l'AICD avec le promoteur de la NEP suivie de son expression (Belyaev et al., 2009, 2010; Nalivaeva and Turner, 2013; Nalivaeva et al., 2012; Pardossi-Piquard and Checler 2012).



Figure 24 : Régulation de la NEP par l'AICD.

D'après Grimm M.O. 2013. La NEP est régulée transcriptionnellement par l'AICD. L'AICD produit par la voie non amyloïdogénique sera protéolysé par les différentes enzymes de dégradation comme par exemple l'IDE et n'aura pas d'activité transcriptionnelle. L'AICD provenant de la voie amyloïdogénique sera transloqué dans le noyau à l'aide de co-facteur en formant un complexe avec Fe65 (le co-facteur majeur). Une fois dans le noyau Fe65/AICD formeront le complexe AFT avec Tip60 initiant la transcription de gènes cibles comme la NEP.

3. Les défauts mitochondriaux dans la MA : liaison moléculaire

Bien que la présence des acteurs clés de la cascade amyloide, directement au sein de la mitochondrie, soit encore discutée, ils ont été associés dans la MA, à la plupart des mécanismes de perturbation de la mitochondrie, de son fonctionnement et de ses processus.

a. Les présénilines

La dégradation autophagique et la clairance des AVs (comme décrit auparavant) caractéristique de la MA, sont altèrées dans les neurones conditionnellement dépourvues de PS1 (Esselens et al., 2004; Wilson et al., 2004), et les mutations de PS1 se traduisent également par des défauts de l'acidification des lysosomes et de leur maturation. Ceci suggère

un rôle de PS1 (indépendant de la γ -sécrétase) dans l'acidification lysosomale, processus essentiel dans l'activation des protéases lysosomales durant l'autophagie (Lee et al., 2010, 2015).

Les mutations de PS1 exacerbent la sensibilité des neurones aux processus de mort cellulaire (Chui et al., 1999; Guo et al., 1997). Les cellules PC12 surexprimant une forme de PS1 mutée (L286V) montrent une sensibilité accrue à l'apoptose. Ce phénomène est médié par la mitochondrie. En effet, une élévation rapide du calcium intracellulaire entraine l'activation des caspases, l'accumulation des ROS et la diminution du potentiel mitochondrial membranaire dans les cellules surexprimant les formes de PS1 mutées. Il peut être antagonisé par l'utilisation de drogues anti-oxydantes ou l'utilisation d'un chélateur de calcium, bloquant la libération du calcium par le RE. Ceci souligne la présence d'un défaut des mitochondries lié à la modulation de l'activité des PS (Popescu and Ankarcrona, 2000; Guo et al., 1998;).

Plusieurs études récentes décrivent une potentielle activité γ -secretase dans la mitochondrie et notamment dans les MAMs. Ces études soulèvent la présence des PS dans ces MAMs. Ainsi, les mutations des gènes PS entrainerai l'altération de leur distribution et donc une altération du métabolisme lipidique et calcique par la destabilisation de ces MAMs.

Enfin, la parkine module la transcription de PS1 et PS2 de manière différentielle, (Duplan et al., 2013). Ainsi, la parkine module l'activité γ -sécrétase par transactivation du promoteur, des niveaux d'ARNm et de l'expression protéique de PS1 (Duplan et al., 2013). D'un point de vue fonctionnel, la parkine induit l'activité γ -sécrétase de PS1 et réprime l'activation des caspases, induites par PS2 et p53 (Elle constitue un répresseur transcriptionnel de p53).

Ces résultats décrivent une implication des PS dans les perturbations de la voie mitophagique décritent dans la MA.

b. L'APP et ses métabolites

L'autophagie se réfère à au moins trois processus par lesquels les constituants intracellulaires sont ciblés vers le lysosome pour leur dégradation : l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA), la microautophagie et la macroautophagie. Pour la CMA, les protéines cytosoliques contenant un motif KFERQ sont sélectivement ciblées vers le lysosome pour leur dégradation. De manière intéressante, l'APP contient cette séquence cible (Park et al., 2016). La CMA et la macroautophagie représentent des voies majeures pour le

renouvellement de la β APP et la génération du peptide A β (Yu et al., 2004, 2005) Les AVs contiennent de l'A β , du CTF β et des composants de la γ -sécrétase. Ainsi, suite à l'induction de l'autophagie par la rapamycine ou la privation de nutriment dans des fibroblastes de souris, le complexe γ -sécrétase est transloqué par l'intermédiaire des endosomes et du RE dans les AVs (le complexe γ -sécrétase est présent à l'intérieur de plusieurs organites sujet à l'autophagie). La NCT, est très abondante dans les membranes externes des lysosomes isolés (Pasternak et al., 2003). Les AVs possèdent une concentration élevée de γ -sécrétase (Yu et al., 2004) qui se traduit par une augmentation de la production de peptide A β (Nixon, 2007; Nixon and Yang, 2011; Nixon et al., 2000). Normalement, le peptide A β généré dans les AVs est délivré principalement aux lysosomes et dégradé par les cathepsines. En condition pathologique, la voie de dégradation lysosomale étant inactivée, (comme lors de mutations sur les PS (Wilson 2004 ; Esselens 2004 ; Yu 2006)) l'accumulation des AVs non dégradés entraine une accumulation de l'A β (Nixon, 2007; Nixon and Yang, 2011; Nixon et al., 2000).



<u>Figure 25</u> : Schéma récapitulatif des perturbations mitochondriales décrites, dues à l'Aβ</u>

L'Aβ mitochondrial entraine différentes perturbations des fonctions mitochondriales comme le signal calcique, la respiration et la production d'ATP et la balance OXPHOS, l'apoptose, le potentiel mitochondrial la dynamique mitochondriale, son transport ou sa clairance.

i. Le peptide $A\beta$ dans la mitochondrie

Bien que la présence de peptide A β et de β APP aient été rapportée dans la mitochondrie par plusieurs études, leurs origines dans la mitochondrie restent toujours une énigme. Ces études montrent une accumulation progressive de A β avec l'âge dans les mitochondries des cerveaux de patients et de modèle de souris dites « MA » avant les dépôts extracellulaires (Anandatheerthavarada et al., 2003; Du et al., 2010; Manczak et al., 2006; Wang et al., 2008a). Cependant, aucune étude n'a établi l'hydrolyse de la β APP par la γ -sécrétase mitochondriale. En effet la β APP et le A β sont présentes au sein des membranes mitochondriales et interagissent avec les protéines résidentes. Le A β extracellulaire pouvant
être internalisé par la mitochondrie (Hansson Petersen et al., 2008), il était possible qu'il soit engendré en dehors de la mitochondrie et importé, sans qu'il ne soit produit par la mitochondrie. Une potentielle pénétration de Aβ dans la mitochondrie via les MAMs (mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membrane) (Pinho et al., 2014) ou via la translocase TOM (Hansson Petersen et al., 2008) a été discuté. Une étude récente a même suggéré que les plaques amyloïdes servaient de sources d'Aβ, puisqu'une réduction du potentiel mitochondrial et une émergence de mitochondries dystrophiques fragmentées aux alentours des plaques Aβ sont constatées dans les modèles de souris AD (Xie et al., 2013).

D'autres études montrent une colocalisation de l'A β 42 avec le complexe II de la chaine de respiration mitochondriale. L'incubation de mitochondries provenant de cerveaux de rats avec le fragment A β 25-35, induit une inhibition du complexe IV en fonction de la dose (Canevari et al., 1999). Des interactions du peptide A β avec diverses protéines de la membrane mitochondriale ont également été rapportées. Ainsi, l'interaction du peptide A β avec l'alcool déshydrogénase, augmente la production de ROS (Lustbader et al., 2004). D'autres interactions du peptide A β avec les protéines de la matrice mitochondriale « A β -binding alcohol dehydrogenase » (ABAD) et cyclophiline D, induisant des effets délétères pour les neurones comme la génération de ROS (Du et al., 2008; Lustbader et al., 2004).

ii. L'A β et le transport mitochondrial

Les processus de transport sont également affectés par le peptide A β et se traduisant par une altération de la motilité mitochondriale (Du et al., 2010; Gegg et al., 2010). La dégénérescence axonale des patients MA est caractérisée par des régions « gonflées » avec des accumulations anormales d'organelles (Stokin et al., 2005). Les mitochondries endommagées sont normalement ciblées vers le soma pour être dégradées par les lysosomes. Un défaut du transport mitochondrial conduit à une accumulation anormale de mitochondries défectueuses dans les régions distales des neurones MA, apportant une explication tangible à l'accumulation d'organelles observée dans la MA.

L'exposition des cultures neuronales au peptide A β ou « A β derived diffusible ligans » ADDLs a pour conséquence la diminution de la densité des mitochondries dans l'axone et de leur motilité (Catalano et al., 2006). Chez la drosophile, la surexpression d'A β ralentit le transport mitochondrial de l'axone entrainant des dysfonctions présynaptiques (Zhao et al., 2010). Les neurones primaires dérivés de souris transgéniques surexprimant du A β exposent - également un problème dans le transport des mitochondries axonales, et des déficiences

synaptiques certainement liées à l'accumulation de l'A β oligomérique mitochondriale (Calkins et al., 2011).

Chez la drosophile, le peptide A β 42 perturbe la localisation des mitochondries et réduit leur nombre dans les axones et les dendrites concomitamment à une augmentation dans le soma (Iijima-Ando et al., 2009; Ling et al., 2009). L'accumulation intracellulaire d'Aß induit la déplétion des mitochondries présynaptiques et diminue leur transport. Une des explications envisagée, serait que le peptide Aß perturbe la stabilité mitochondriale en diminuant l'acétylation de la tubuline. Les cerveaux MA sont caractérisés par une diminution de l'acétylation de la tubuline et l'augmentation de HDAC6, la seule déacétylase cytosolique ayant comme substrat majeur la tubuline, qui régule le trafic mitochondrial (Busciglio et al., 2002; Reddy, 2011). De plus, le peptide Aβ régule le trafic mitochondrial en activant la GSK3β, un régulateur négatif de la kinésine-1 (Morfini et al., 2002). L'activité excessive de la GSK3β est associée au blocage du mouvement des mitochondries. L'utilisation d'inhibiteur de GSK3ß prévient les défauts de transport mitochondriaux induit par le peptide Aß (Koh et al., 2008). Le peptide Aß cause l'élévation du niveau de calcium par l'augmentation de l'activité de plusieurs kinases entrainant la phosphorylation de Tau, la perturbation du réseau mitochondrial et des défauts du trafic mitochondrial (Cao et al., 2013; Noble et al., 2003; Puig et al., 2004). Enfin, une altération bioénergétique mitochondriale contribue également à l'altération du trafic mitochondrial dans la MA : 1) le calcium cytosolique augmente et contribue au défaut du trafic mitochondrial en diminuant les niveaux d'ATP ; 2) Le blocage de l'activité cytochrome oxydase diminue les niveaux d'ATP (Parker et al., 1990).

iii. L'Aβ et la dynamique mitochondriale

La surexpression de la β APP et du peptide A β affecte la dynamique mitochondriale et les processus de fusion/fission (Calkins et al., 2011; Manczak et al., 2011; Wang et al., 2008b). Les neurones exposés au A β dérivé de ligands diffusibles (ADDLs) ou aux oligomères de A β ou les neurones primaires dérivés de modèles de souris transgéniques surexprimant de l'APP et par conséquant accumulant de l'A β , présentent des mitochondries fragmentées ainsi qu'une réduction de leur densité (Calkins et al., 2011; Du et al., 2010; Wang et al., 2009).

Une autre étude montre que des cellules neuronales incubées avec un milieu conditionné de cellules exprimant de manière stable les formes mutantes d'APP associées à la MA (APP suédoise), augmentent la fission mitochondriale causée par l'élévation du niveau de

Drp1 S-nytrosylé, comme décrit dans les cerveaux MA humains et les modèles de souris MA (Cho et al., 2009).

Les effets toxiques du peptide A β semblent corrélés à l'augmentation de l'activité de Drp1. En effet, l'expression de Drp1 et de Fis1 est augmentée dans des cerveaux de patients MA (Calkins et al., 2011; Manczak et al., 2011; Wang et al., 2008b) alors que Mfn1, Mfn2 et Opa1 diminuent (Wang et al., 2009). L'augmentation de la production d'A β , et donc de son interaction avec Drp1 et Tau phosphorylé, aboutit à une fragmentation anormale des mitochondries. Cependant une autre équipe a contredit ces résultats en décrivant une diminution du niveau de Drp1 dans des fibroblastes et cerveaux de patients atteints de MA sporadique (Wang et al., 2008c). Ils ont montré que la surexpression de la β APP dans des cellules de neuroblastomes, entraine une fragmentation des mitochondries et une diminution du niveau de Drp1. La surexpression de Drp1 et d'Opa1, peut partiellement contrecarrer les défauts associés à la surexpression de β APP (Wang et al., 2008b; 2008c). Dans les cellules surexprimant la mutation suédoise sur l'APP, une diminution de Drp1, Opa1 et une augmentation Fis1 (Wang et al., 2008b; 2008c) induisent de sévères fragmentations réduisant le nombre de mitochondries Wang et al., 2008b; 2008c).

iv. Effet de l'Aβ sur les processus autophagique / mitophagique

Plusieurs évidences soulèvent un effet diret de l'accumulation du A β sur les processus autophagiques :

Des altérations autophagiques et lysosomales sont observées chez les souris transgéniques CNRD8 qui surexpriment l'APP humaine avec des mutations associées à la MA (APPsuédoise) (Yang et al., 2008a; Yang et al., 2011a, 2011b), du même type que celles présentes dans le modèle de souris transgénique PS/APP (Cataldo et al., 2004; Yu et al., 2005). Ceci indique que la surexpression de la β APP mutante peut entrainer la pathologie autophagique-lysosomale. Les neurones hippocampaux et corticaux de ces souris présentent des autolysosomes élargis et gonflés, contenant les substrats non digérés comme LC3-II, des protéines ubiquitinylées, et du peptide A β , ressemblant aux AVs des cerveaux de souris invalidés en cathepsines (comme décrit dans les chapitres précédents).

Pour confirmer l'évidence d'un défaut de clairance des AVs, la stimulation de la protéolyse lysosomale restaure les déficits de mémoire et d'apprentissage en diminuant le niveau extracellulaire de déposition amyloïde et le niveau total d'Aβ40 et Aβ42 (Yang et al., 2011a, 2011b).

De plus, dans les cerveaux de patients MA et de modèle de souris « MA », des études montrent une augmentation de la production de ROS qui modifie l'activité protéolytique de protéases de clairances du peptide A β , et l'accumulation de peptide A β , entrainant de la toxicité mitochondriale (Alikhani et al., 2011; Falkevall et al., 2006).

En ce sens, l'accumulation de peptide A β 42 et non d'A β 40 dans les neurones de drosophiles induit des dysfonctions de l'autophagie et des lysosomes en fonction de l'âge, caractérisés par une accumulation d'autolysosomes (Ling et al., 2009).

L'utilisation d'un modèle d'injection de A β dans le rat, a permis de mettre en évidence une forte augmentation des marqueurs mitophagiques dans l'hippocampe, revenant concomitamment avec le début de l'augmentation des marqueurs apoptotiques vers un niveau basal. Cette stimulation de la mitophagie ressemble à une tentative primaire d'empêcher la crise energétique des neurones avant leur dégénérescence (Shaerzadeh et al., 2014).

L'accumulation d'A β suite à un défaut de clairance des AVs ou l'altération de l'activité des protéases responsables de sa dégradation, entraine une perturbation de l'autophagie générale et même sélective.

c. La parkine dans la MA

La majorité des pathologies neurodégénératives sont liées à des désordres au niveau de l'autophagie. Quelques études indiquent également une perturbation de la mitophagie (Hirai et al., 2001; Moreira et al., 2007a, 2007b). L'une des voies principales dans le contrôle de la mitophagie concerne la voie PINK1/parkine (développée dans les chapitres précédents). Plusieurs études suggèrent que la parkine peut contribuer à l'établissement d'autres pathologies neurodégénératives incluant la MA.

Tout d'abord, il a été décrit une augmentation du niveau de la parkine dans les tissus cérébraux post-mortem de patients atteints de MA (Witte et al., 2009). De plus, la parkine est régulée par Tau. Ainsi, dans des patients MA, Tau peut induire, suite au recrutement aberrant de la parkine, un recyclage mitochondrial excessif, à la base d'une détérioration synaptique et d'une mort neuronale accrue (Corsetti et al., 2015). De plus, plusieurs études ont décrit une phosphorylation anormale de Tau chez des patients portant des mutations de la parkine (Sánchez et al., 2002; van de Warrenburg et al., 2001). Une accumulation de Tau est observée durant le vieillissement des souris dépourvues de parkine (Rodríguez-Navarro et al., 2007). De manière intéréssante, la surexpression d'une forme de Tau mutée chez les souris invalidée

pour le gène de la parkine, est accompagnée de problèmes comportementaux, et de mémorisation (Rodríguez-Navarro et al., 2008).

La parkine est impliquée dans la régulation des sous unités catalytiques PS1 et PS2 du complexe enzymatique de la γ -sécrétase (Duplan et al., 2013). Elle colocalise avec les lésions vasculaires de peptide A β dans les cerveaux MA où elle ubiquitine le peptide A β 42, et augmente sa dégradation. Elle diminue les niveaux A β 42 (Rosen et al., 2006) en facilitant la clairance à travers la restauration de l'activité du protéasome et de l'autophagie dépendante de beclin (Burns et al., 2009; Khandelwal et al., 2011; Rosen et al., 2010).

Lors de la progression de la maladie, l'augmentation de la mitophagie est accompagnée de la déplétion de la parkine cytosolique (Khandelwal et al., 2011; Martín-Maestro et al., 2016) et par une accumulation de PINK1.

d. La protéine PINK1 dans la MA

Pour rappel, il existe un lien fonctionnel entre la parkine et PINK1 dans le contrôle de la mitophagie. PINK1, est le senseur mitochondrial qui contrôle la mitophagie et la dynamique mitochondriale qui sont altérées dans la MA. Très peu d'études concernent l'implication de PINK1 au sein de la MA. La protéine PINK1 est présente au niveau des dépôts amyloides

L'évaluation immunohistochimique de PINK1 dans les cerveaux de patients MA a établi une colocalisation avec les plaques séniles et les dépôts amyloïdes vasculaires mais pas avec les dégénérescences neurofibrillaires (Wilhelmus et al., 2011).

i. La régulation du niveau de PINK1 dans des cerveaux «alzheimers»

De manière plus directe, des études de microréseaux « microarray » décrivent une modulation de PINK1 dans l'hippocampe et le cortex temporal des cerveaux de modèles «alzheimers» de souris transgéniques 2576 portant la mutation suédoise ainsi que dans l'hippocampe et le cortex temporal de cerveaux de patients MA (George et al., 2010). Plus récemment, une autre étude a confirmé la modulation de PINK1 directement dans des cerveaux d'un autre modèle de souris «alzheimer» APPsuédoise/PS1ΔE9, portant une mutation sur l'APP. Dans cette étude une augmentation du niveau protéique de PINK1 ainsi que de la parkine est observée, proportionnellement à l'âge de la souris. Ce résultat est similaire dans la lignée cellulaire portant la mutation APPsuédoise (Wang et al., 2015).

ii. La voie de signalisation PS-PTEN-PINK1

Des régulateurs clairement identifiés et caractérisés de PINK1 sont aussi retrouvés altérés dans la MA. PTEN représente ainsi un exemple parfait. En effet il a été montré que les PS sont capables de réguler PTEN (Zhang et al., 2008a) qui est le premier régulateurs identifié de PINK-1 (Unoki and Nakamura, 2001). PTEN est diminué dans les neurones hippocampiques de cerveaux de patients MA (Griffin et al., 2005; Rickle et al., 2006; Zhang et al., 2006). PTEN a aussi été associé à la pathologie « Tau » (Frere and Slutsky, 2016; Sonoda et al., 2010; Zhang et al., 2006). La surexpression de PTEN altère la phosphorylation de Tau et augmente l'association de Tau au microtubule tout en diminuant la formation d'agrégats de Tau. De plus, l'invalidation ou l'inactivation par mutation de PTEN entraine un phénotype opposé accompagné d'une diminution de la croissance des neurones (Zhang et al., 2006).

Plus récemment, une autre étude a décrit une distribution de PTEN altérée dans les neurones de cerveaux de patients MA. Dans cette étude, PTEN est délocalisée du noyau vers le cytoplasme et est détectable dans les dégénérescences neurofibrillaires (Sonoda et al., 2010). Aujourd'hui il est avéré que PTEN régule de nombreuses fonctions dans le SNC, et que sa dérégulation affecte la neurogénèse, la croissance neuronale, la synaptogénèse, la plasticité et transmission synaptique (Zhou and Parada, 2012).

Les mutations humaines ou la délétion chez la souris de PTEN, sont impliquées dans divers désordres neurologiques comme la macroencéphalie, l'ataxie, les troubles convulsifs, l'autisme et le retard mental (Zhou and Parada, 2012). Dernièrement L'equipe de Knafo a établi que l'injection intracérébroventriculaire pendant 3-4 semaines d'un inhibiteur pharmacologique de PTEN dans des souris adultes MA (APP, PS1 ou APP/PS1) améliore les déficits cognitifs et la LTP dans la voie hippocampale. Ces résultats Soulevent un rôle de PTEN dans la toxicité liée au peptide A β .

iii. La protéine PINK1 interagit avec la protéine Beclin1

D'autres protéines intéragissants avec PINK1 ont également été retrouvées altérées dans la MA. Ainsi, PINK1 intéragit avec Beclin-1 dans la mitochondrie (Michiorri et al., 2010) menant à leur clairance via un processus autophagique. L'activation de la voie PINK1/parkine/Beclin-1 suite aux dommages mitochondriaux augmentera donc dégradation des mitochondries endommagées. Plusieurs études ont dans ce sens, décrit l'induction de la clairance des dépôts de peptides amyloïdes intracellulaires par la parkine (Burns et al., 2009;

Khandelwal et al., 2011; Rosen et al., 2010), cette dernière pouvant induire cette dégradation par l'induction de l'autophagie via beclin-1. De manière intéressante, Beclin 1 est diminuée au sein de la MA. Cette déficience de Beclin 1 peut donc provoquer l'accumulation de mitochondries défectives conjointement à un défaut d'autophagie.

iv. La protéine PINK1 interagit avec la protéine PGC1- α

PINK1 est directement associée à PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptorgamma co-activator 1 alpha) au sein de l'IMM et dans la matrice mitochondriale (Choi et al., 2013). Elles semblent réguler l'intégrité mitochondriale de manière coopérative. Des études récentes montrent un rôle important de PGC-1 α dans la MA. En effet, l'expression de PGC1- α est dérégulée dans des hippocampes de patients MA (Qin et al., 2009) et semble influencer l'expression de PINK1 (Choi et al., 2013, 2014).

Toutes ces pistes indirectes, laissent présager un potentiel rôle/dérégulation de PINK1 dans la MA.

IV. Les défauts autophagique et implication de PINK1 dans le cancer

A. Maladies neurodégénératives et cancer : un mécanisme commun des voies cellulaires communes et/ou une balance entre la survie et la mort cellulaire

Plusieurs études épidémiologiques montrent une diminution de la probabilité de développer un cancer chez les patients MP (D'Amelio et al., 2004; Vanacore et al., 1999). Les maladies neurodégénératives et le cancer sont caractérisés par l'exacerbation de deux voies de signalisation opposées qui conduisent à un excès de mort cellulaire ou inversement, de survie cellulaire. Plusieurs travaux suggèrent l'implication de gènes communs (Inzelberg and Jankovic, 2007), régissant des voies de signalisation communes mais diversement affectées dans ces deux pathologies. Plusieurs processus moléculaires et systèmes de signalisation incluant le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la dynamique mitochondriale sont altérés dans ces pathologies. Plusieurs gènes associés à la MP dont PINK1, ont été décris comme contribuant à la tumorigénèse. Ceci corrobore d'une part l'implication des processus autophagiques dans l'étiologie des cancers et, d'autre part, le lien moléculaire entre les gènes associés à la MP et la protéine suppresseur de tumeurs p53.

B. L'autophagie dans le cancer

La dysfonction des processus autophagiques est un important facteur de la tumorigénèse. Les altérations de l'autophagie dans le cancer dépendent de multiples facteurs, incluant le stade de la tumeur, le contexte cellulaire, et l'origine du tissu (*Figure 26*).



Figure 26 : Le rôle de l'autophagie en fonction du stade de la tumeur.

L'autophagie participe à la défense anti-tumorale en luttant contre les dommages subis des organites et du génome empéchant le basculement des cellules saines en cellules cancéreuses, elle inhibe la mise en place de l'angiogénèse et la nécrose deux processus clés dans l'établissement des tumeurs.Cependant, l'autophagie contribue au processus tumorigéniques en participant à la protection des cellules cancéreuses contre les agents thérapeutiques anti-cancéreux, dans la survie des cellules cancéreuses invasives, et dans la résistance au stress oxydatif des cellules tumorales établies.

1. Autophagie et répression de la tumorigénèse

L'autophagie intervient lors des phases précoces de la tumorigénèse pour en limiter la progression. En revanche, quand la tumeur est établie, l'autophagie fonctionne comme une voie de survie en réponse à divers stress imposés durant la progression du cancer et la chimiothérapie (Levine, 2007; Mathew et al., 2007; Rosenfeldt and Ryan, 2009; Wilkinson and Ryan, 2010 Chen and Debnath, 2010; Kondo et al., 2005).

La délétion de gènes codant des protéines autophagiques est commune dans les cancers humains ainsi que l'altération des gènes codant des protéines oncogéniques (NF-KB, FoxO ou HIF-1) ou suppresseurs de tumeurs (p53, parkine). La perte des gènes codant des protéines autophagiques augmente les dommages sur l'ADN, l'instabilité chromosomique, dérégule le contrôle de la croissance cellulaire ainsi que des défauts mitochondriaux (White, 2015). Les évidences les plus directes d'un effet protecteur de l'autophagie contre le cancer, viennent de l'étude génétique des souris invalidées en gènes codant des protéines de la machinerie autophagique (Atg7) (Komatsu et al., 2005; Kuma et al., 2004; Lee et al., 2012). Elles montrent une corrélation entre un défaut de l'autophagie et une augmentation de l'initiation des tumeurs bénignes, corroborant l'hypothèse que l'autophagie possède des actions suppressives sur l'initiation de tumeurs qui basculent une fois la tumeur établie.

L'autophagie contribue à l'inactivation de plusieurs autres processus tumorigéniques :

- L'autophagie assure la maintenance des cellules souches normales. Une étape clé dans le processus de transformation, caractérisée par le changement de l'état de prolifération ou de différenciation cellulaire.
- Elle contribue à deux mécanismes suppresseurs de tumeurs importants, qui sont la mort cellulaire (Berry and Baehrecke, 2008; Kroemer and Levine, 2008) et la sénéscence (Xue et al., 2007; Young et al., 2009).
- L'autophagie est impliquée dans les processus anti-inflammatoires (Degenhardt et al., 2006; Deretic et al., 2013; Rubinsztein et al., 2012) or la transformation en cellules malignes est stimulée par un environnement inflammatoire caractérisé par une accumulation de ROS (Mathew et al., 2009; Reuter et al., 2010; Scherz-Shouval et al., 2007) et de cytokines mitogéniques (Coussens et al., 2013).
- Finalement l'autophagie par son rôle dans la défense anti-virale et anti-bactérienne, supprime les pathogènes potentiellement carcinogènes.

2. L'autophagie et activation de la tumorigénèse

Le rôle de l'autophagie en tant que support de la prolifération des tumeurs, bien que complexe, reste centré autour d'un principe. L'augmentation des besoins métaboliques et de la synthèse est nécessaire pour des cellules qui se divisent rapidement dans un milieu austère tumoral (Kimmelman, 2015).

Dans des conditions normales, le niveau autophagique est bas. Lors d'un stress, l'autophagie est rapidement induite, conduisant à la dégradation des composants intracellulaires. Cette dégradation fournit des provisions au métabolisme pour supporter l'absence de nutriments extracellulaires. Ce système de survie métabolique est aussi activé dans les cancers. Plusieurs lignées de cellules cancéreuses montrent un haut niveau basal d'autophagie, suggérant une compensation cellulaire ou que les évènements oncogéniques génèrent un stress métabolique. Ce stress nécessite l'activation de l'autophagie, pour soutenir la survie des cellules tumorales (Degenhardt et al., 2006; Guo et al., 2011, 2013). Beaucoup de tumeurs contiennent des régions pauvrement vascularisées, caractérisées par un manque de nutriments et d'oxygène, associées à un haut niveau d'autophagosomes (Yang et al., 2014). Les tumeurs se servent de l'autophagie pour s'approvisionner en nutriments, ce qui est considéré comme un processus oncogénique, puisque l'autophagie est augmentée et semble avoir un effet cytoprotecteur des cellules tumorales. Par conséquent, l'invalidation des gènes codant pour des protéines essentielles à l'autophagie dans des lignées de cellules cancéreuses, réduit la survie et la tumorigénèse. L'augmentation de l'expression des ces gènes, devient donc une signature d'un phénotype plus agressif et invasif.

La transformation en cellules malignes est liée au changement métabolique de la consommation de pyruvate, dérivé de la glycolyse par la phosphorylation oxydative, en un modèle métabolique où la capture du glucose est augmentée de manière significative afin de soutenirles réactions anaboliques et la défense antioxydante. La respiration mitochondriale reste haute pour satisfaire aux demandes énergétiques, et plusieurs acides aminés, comme la glutamine et la sérine, deviennent essentielles pour faire face à des fonctions métaboliques exacerbées (Hanahan and Weinberg, 2011).

3. La mitophagie et la dynamique mitochondriale dans le cancer

Les études concernant p62 dans la tumorigénèse montrent que l'invalidation de p62 réduit la tumorigénèse (Inami et al., 2011). La surexpression de p62 génère un stress oxydatif et une croissance de la tumeur. Les récepteurs mitophagiques sont directement régulés selon le type de cancer et semblent directement associés à la progression et la prolifération du carcinome ainsi qu'à l'agressivité de ce dernier.

Un autre acteur clé de la mitophagie, la parkine, est aussi fréquemment absente (Cesari et al., 2003; Gong et al., 2014), éteinte ou indétectable dans différentes variétés de cancers humains (cancer des ovaires, cancer du sein, cancer de la vessie) suggérant un rôle de prévention des cancers par la mitophagie. Dans des souris invalidées en parkine, l'incidence de développement spontanné de tumeurs hépatiques est augmentée. La parkine régule les niveaux d'effecteurs clés du cycle cellulaire incluant la cycline D1, la cycline E et CDK4, contribuant à son rôle de suppresseur de tumeur. Elles sont directement influencées par les mutations de la parkine qui influent notamment sur leurs dégradations et expliquent les dérégulations associées au développement de certains cancers comme les glioblastomes, les cancers de la langue ou du colon.

La dynamique mitochondriale est aussi dérégulée dans les cancers. Les cellules cancéreuses exhibent très souvent des mitochondries fragmentées. Drp1 est très fortement exprimé et activé alors que Mfn2 est diminuée. L'augmentation de la fission et la diminution de la fusion sont liées au phénotype sévère du cancer qui est antagonisé par l'inhibition de Drp1 ou la surexpression de Mfn2, favorisant l'arrêt du cycle et l'apoptose spontanée (Rehman et al., 2012). Le fractionnement mitochondrial est corrélé avec un défaut de l'activité du complexe I, une augmentation de la glycolyse, une réduction de l'accumulation des ROS et une diminution des réponses aux thérapies cytotoxiques (Hagenbuchner et al., 2013). La machinerie impliquée dans la dynamique mitochondriale peut contribuer aux ajustements cellulaires face aux pénuries d'oxygène, de nutriments ou à des interventions thérapeutiques. Le transport mitochondrial est aussi important dans les processus cancéreux puisque la perturbation des liens microtubules/mitochondries par l'intermédiaire de l'invalidation de Miro1, inhibe le trafic mitochondrial et réduit la migration des cellules cancéreuses (Desai et al., 2013). La plupart des études suggérent que la fission est un prérequis pour la relocalisation efficace des mitochondries, l'activation de Drp1 ou la baisse de Mfn1 observées dans les cellules cancéreuses invasives.

C. p53, un dénominateur moléculaire commun aux pathologies neurodégénératives et cancer

La plupart des études de la protéine p53 concerne l'évaluation de p53 en tant que suppresseur de tumeurs et notamment son rôle majeur dans l'arrêt de la croissance et l'apoptose. Dans les MA et MP qui représentent les désordres neurodégénératifs les plus fréquents, la mort cellulaire apparait comme l'un des principaux facteurs étiologiques. De manière intéressante, plusieurs études menées au laboratoire, ont démontré un dialogue moléculaire entre p53 et plusieurs protéines clés dans le développement de la MA et de la MP ainsi qu'une dérégulation de ces dernières dans les cancers (Checler and Alves da Costa, 2014a, 2014b). Inversement, plus de la moitié des cancers sont liés à des mutations de p53 menant à un défaut de l'apoptose dépendante de p53. Cet impact de p53 dans ces pathologies a suscité de nombreuses études visant à concevoir des outils chimiques ou des approches

biologiques pour restaurer les défauts de p53 ou pour sa suractivation. De plus, des études récentes rapportent une régulation autophagique par p53 (Jones et al., 2005; Vakifahmetoglu-Norberg et al., 2013, 2016), éléments qui ont conditionné les travaux effectués lors de ma thèse.



Figure 27 : Régulation de l'autophagie dépendante de la localisation de p53.

D'après Maiuri M.C. 2008. Dichotomie du rôle de p53 en fonction de la localisation de p53. La forme p53 nucléaire à travers son activité transcriptionnelle induit l'arrêt du cycle cellulaire suite à un stress conduisant à la réparation de l'ADN ou à l'apoptose. Il active également des gènes proautophagiques. La forme cytosolique de p53 aura pour effet la levée de la transcription des gènes proautophagiques.

1. p53 et autophagie dans le cancer

Plusieurs voies de signalisation mettant en jeu p53 peuvent induire l'autophagie. p53 induit la phosphorylation oxydative et inhibe la glycolyse, qui d'un point de vue métabolisme, s'oppose à l'effet WARBURG, caractéristique des cancers (Gottlieb and Vousden, 2010). p53 est activée par de nombreux stress cellulaires incluant entre autres, le stress génotoxique, l'activation oncogénique, le stress hypoxique. Il orchestre différentes grandes voies de réponses cellulaires directement associées aux processus de tumorigénèse comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénéscence, le métabolisme, la différenciation, le blocage de l'angiogénèse, et la modulation de l'autophagie.

a. p53 et le contrôle qualité des mitochondries

En condition de stress, p53 peut également contrôler l'état des mitochondries via la dégradation mitophagique ou la dégradation des protéines endommagées. p53 induit une protéine, Mieap, qui influence directement le contrôle de l'homéostasie mitochondriale (Kamino et al., 2016; Tsuneki et al., 2015). Mieap répare les mitochondries endommagées par l'élimination lysosomale (intra-organelle) sans destruction de la structure mitochondriale (Kitamura et al., 2011). Si le stress augmente chroniquement, la mitochondrie sera détruite par l'accumulation des lysosomes. p53 peut également réguler la mitophagie. En effet, il a été rapporté une régulation mutuelle entre une protéine effectrice dans la mitophagie, la parkine, mais également avec les récepteurs mitophagiques. Les modifications de la nitrosylation de la parkine abolissent la capacité de la parkine à réduire l'expression de p53 (Sunico et al., 2013).

b. p53 dans la dynamique mitochondriale

L'identification de la formation d'un complexe entre p53 et Drp1 suggère un contrôle de la dynamique mitochondriale par p53. Des études récentes montrent une altération de l'expression et de l'activité de plusieurs protéines responsables de la fission/fusion par p53. p53 induit l'expression transcriptionnelle de Mfn2 dans des HepG2, «hepatocellular carcinoma cells» (He et al., 2010), et de Drp1 dans des cardiomyocytes (Li et al., 2010). p53 peut également induire la fission par l'induction de la translocation de Drp1 dans la mitochondrie dans des cellules Hela (Wang et al., 2011b). Une autre étude récente implique la liaison de p53 sur Drp1 comme l'évènement causal de la fragmentation mitochondriale observée dans la maladie d'Huntington (Guo et al., 2013). En effet, dans ce modèle, la suppression de p53 module la fragmentation et les dysfonctions mitochondriaux associées à la maladie, menant à la mort cellulaire. Enfin, les neurones traités avec des agents toxiques endommageant l'ADN présentent des mitochondries allongées, suggérant une suppression de l'expression de Drp1 et de la parkine par p53. La surexpression de la parkine ou de Drp1 corrige la morphologie mitochondriale et bloque la mort neuronale (Wang et al., 2013).

c. p53 et autophagie

La déficience en autophagie entraine des dommages profonds de l'ADN suggérant, une fonction protectrice contre la toxicité subit par l'ADN (Karantza-Wadsworth et al., 2007; Mathew et al., 2007). Cette fonction est confirmée par l'induction autophagique de la survie cellulaire en réponse à des agents pharmacologiques génotoxiques (Svensson et al., 2012). Le stress génotoxique étant l'un des signaux activateurs de p53, l'autophagie prévient l'apoptose induite par p53. L'immunoprécipitation de la chromatine et le séquençage, suite à l'induction de dommage de l'ADN, ont permis de mettre en évidence l'activation d'une batterie de gènes autophagiques, dont ULK1 et ATG7, par p53 (Kenzelmann Broz and Attardi, 2013; Kenzelmann Broz et al., 2013).

Selon les premières études, p53 est un régulateur positif de l'autophagie en activant de manière transcriptionnelle les gènes d'induction de l'autophagie. Des protéines encore très peu décrites comme la « DNA damage regulated autophagy modulator 1 » DRAM sont activées par p53, et l'induction de DRAM favorise l'autophagie (Crighton et al., 2006a, 2007). DRAM semble même être requise pour l'induction de l'apoptose dépendante de p53, sans pour autant que les mécanismes soient clairs.

En revanche, l'invalidation de p53 contre toute attente, active l'autophagie induisant. Une éventuelle explication serait que l'absence de p53 engendre un stress, requérant une réparation par l'autophagie. Mais ces résultats soulèvent la complexité de régulation de l'autophagie par p53 qui peut réguler positivement ou négativement ce même processus.

La stimulation de p53 par des stress oncogéniques ou génotoxiques augmente l'autophagie alors qu'un niveau basal de p53, en absence de stress, l'inhibe. Au final p53, joue un double rôle dans la régulation de l'autophagie dépendant de sa localisation subcellulaire. Dans le noyau, les fonctions de p53 sont pro-autophagiques de manière dépendante ou non de son activité facteur de transcription, à l'encontre de sa localisation cytoplasmique, où il supprime l'induction de l'autophagie (Maiuri et al., 2010).

D. L'implication de PINK1 dans le cancer

1. La voie PTEN-FOXO3a-PINK1

Les fonctions de suppresseur de tumeur de PTEN sont notamment liées à l'inhibition de la voie de survie et de croissance cellulaire qui représente une voie oncogénique majeure. Les mutations de PTEN ont été identifiées dans de nombreux cancers humains, plaçant PTEN juste derrière p53, comme l'un des protéines les plus fréquemment mutée dans les cancers humains (Yin and Shen, 2008). Cette voie de survie inhibée par PTEN, représente un important « moteur » de la tumorigénèse (Coutte et al., 2012; Parsons and Simpson, 2003), via l'augmentation de la croissance cellulaire, la prolifération, la motilité, la protection contre l'apoptose, la glycolyse, des processus critiques pour la survie des cellules cancéreuses mais également par sa régulation du facteur de transcription FOXO.

FOXO3a représente à ce jour le seul facteur de transcription régulant PINK1 directement. Ainsi FOXO3a se lie à plusieurs éléments de liaisons identifiés sur le promoteur de PINK1 (Mei et al., 2009). Le rôle de FOXO dans les processus cancéreux reste encore débattu (Gan et al., 2010; Kloet and Burgering, 2011; Paik et al., 2007; Zhang et al., 2011b). Sa délétion prédispose au cancer (Paik et al., 2007). Il induit la transcription de plusieurs protéines pro-apoptotiques (Fu and Tindall, 2008) qui entrainent, suite à un stress, l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire. Il a également été montré comme étant un inducteur du processus d'invasion suite à son activation par des metalloprotéases de la matrice (Storz et al., 2009).

En conséquence, PINK1 pourrait représenter un nouveau candidat capable de moduler la voie de suppression de la croissance cellulaire par PTEN. Comme attendu, du fait du caractère anti-cancérigène de PTEN, et de sa régulation positive sur PINK1, la surexpression de PINK1 n'induit pas d'inhibition de la croissance cellulaire dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Inversement, des études plus récentes menées avec des fibroblastes et de lignées de cellules cancéreuses invalidées en PINK1 suggérent un rôle de PINK1 dans la promotion des tumeurs (O'Flanagan et al., 2015). Par ailleurs, même si PINK1 fût découverte suite à son activation par PTEN, aucune autre étude n'a établi l'importance de ce lien fonctionnel (ou sa dérégulation) dans une pathologie.

2. Implication de PINK1 dans le cancer

a. Expression de PINK1 dans le cancer

La première description de PINK1 dans le cancer a été faite par Unoki et Nakamura en 2001 qui montraient une augmentation de l'ARNm de PINK dans des cellules cancéreuses (HEC-151 et Ishikawa3-H12 des cellules de l'endomètre) suite à la surexpression exogène de PTEN.

Les premières analyses génomiques montrent que PINK1 se trouve sur le chromosome 1p36 qui est un site fréquemment délété dans un grand nombre de cancers et qui est supposé abriter un ou plusieurs suppresseurs de tumeurs. Il se situe également à coté de la région chromosomique 1p31.1-34.3 où les pertes d'hétérozygotie (LOH) sont fréquemment observées dans le cancer de l'endomètre (Arlt et al., 1996). L'expression de PINK1 est également augmentée dans des lignées cellulaires murines de cancer avec un haut potentiel métastasique (Nakajima et al., 2003).

Suite à une étude de criblage et à l'utilisation de siRNA dirigées contre le kinome et le phosphatome, PINK1 a été identifié comme un élément essentiel pour la survie cellulaire et identifiant PINK1 comme cible thérapeutique potentielle contre le cancer (MacKeigan et al., 2005). Néanmoins, la modulation de l'expression protéique de PINK1 est différente selon le type de cancers étudié. Dans les cancers du sein, colorectaux, et de l'endomètre, on retrouve une expression protéique de PINK1 augmentée à l'inverse des niveaux d'expression protéique mesurés dans les sarcomes, les neuroblastomes et les leucémies. Des méta-analyses d'ensemble de données collectées à partir de patients souffrant du cancer (Oncomine, COSMIC databases) ont permis de montrer une diminution sévère de l'expression des ARNm de PINK1 dans des tumeurs malignes de l'ovaire, du foie, et des carcinomes du rein tandis qu'elle est augmentée dans des cancers du rein, de l'endomètre, hématopoïétique ou des glandes parathyroides. Ces résultats soulèvent l'existence d'un possible double rôle pro- et/ou anti-tumorigénèse de PINK1 selon le contexte biologique cancéreux (Berthier et al., 2011).

b. Les mutations de PINK1 associées au cancer

Un faible nombre de mutations de PINK1 distinctes de celles associées à la MP, ont été identifiées dans plusieurs cancers comme le cancer de l'endomètre, de l'œsophage ou des ovaires (COSMIS database). D'autres mutations hétérozygotes associées aux formes idiopathiques de MP, situées sur le domaine catalytique de PINK1 réduisant son activité kinase, L437P, A279H, ont été identifiées comme variants rares de la lignée germinale prédisposant au neuroblastome (Pugh et al., 2013) mais leur influence demeure incertaine.

c. Associations de PINK1 avec d'autres gènes liés au développement tumoral

D'autres gènes fonctionnellement liés à PINK1, ont été impliqués dans le processus de tumorigénèse. Des mutations de la parkine et du gène de DJ-1 ont été reportées dans différents types de cancers (Inzelberg and Jankovic, 2007). Ainsi, la parkine et PINK1 pourraient être des suppresseurs de tumeurs, alors que DJ-1 agirait plutôt un oncogène via sa régulation négative par PTEN. De manière intéressante, la parkine et DJ-1 ont été décrites comme régulées/régulateurs de la voie de survie cellulaire (Fitzgerald and Plun-Favreau, 2008).

d. Les fonctions de PINK1 associées au cancer

i. La fonction PINK1 anti-apoptotique

Les formes cytosoliques ou mitochondriales de PINK1 possèdent toutes des fonctions importantes dans les processus de survie, de contrôle de la mort cellulaire et de cytoprotection via le contrôle de la voie protéasomale, de l'autophagie mitochondriale (bioénergie, dynamique et homéostasie mitochodondriale), de la régulation du calcium, de NF-KB ou de régulation de la voie de survie cellulaire (comme déjà abordé précédemment). Récemment il a été décrit que la diminution de PINK1 sensibilise les cellules cancéreuses de la vessie associée avec l'augmentation de la production de ROS, la diminution des protéines de Bcl-xL et TRAP1 et l'augmentation de la protéine Bax.

ii. PINK1 régule les processus de tumorigénèse : la prolifération, le cycle cellulaire,l'invasion, la migration cellulaire

Une nouvelle fonction de PINK1 en tant que régulateur positif de la progression du cycle cellulaire, entrainant un phénotype associé au cancer à été récemment démontré (O'Flanagan et al., 2015). La délétion de PINK1 réduit la prolifération, le nombre de colonies, la migration et l'invasion dans plusieurs modèles cellulaires. De manière plus détaillée, la déficience en PINK1 entraine une multinucléation et un arrêt du cycle durant la phase G2/M qui résulte en une réduction de la capacité de la cellule à sortir du cycle cellulaire après déprivation de sérum.

Objectifs

La mitochondrie est au cœur des désordres cellulaires caractérisant les pathologies, neurodégénératives et cancéreuse qui partagent des voies de signalisation commune. La mitophagie, un processus qui peut être protecteur ou destructeur, est associée à divers effecteurs dont PINK1 et la parkine. Les objectifs de ma thèse sont axés sur l'identification et la compréhension de nouveaux liens régulationnels impliquant la protéine PINK1, dans un contexte dégénératif ou prolifératif permettant de manière indirect une meilleur compréhension des régulations ou dérégulations de processus autophagiques dans un deux contextes pathologiques différents.

La thèse se décline en deux parties : l'étude de la régulation de PINK1 dans la MA et la régulation de PINK1 par p53.

Ces deux parties de ma thèse, seront traitées sous forme d'article. Le premier article (1) est actuellement engagé dans un processus de révision dans le journal Biological Psychiatry. Le second (2) dont un « préprint » a été ébauché devrait être soumis incéssament.

1- Goiran T., Duplan E., Chami M., Bourgeois A., Lauritzen I., Elmanaa W., Dunys J., You H., Stambolic V., Biféri M.G., Barkats M., Pimplikar S., Sergeant N., Colin M., Morais V., Pardossi-Piquard R., Checler F. and Alves Da Costa C. βAPP intracellular domain controls mitochondrial function by modulating Pink-1 transcription in cells and in Alzheimer mice models.

2- Goiran T., Duplan E., Rouland L., Elmanaa W., Lauritzen I., Dunys J., You H., Checler F. and Alves Da Costa C.. **p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional regulation**

ARTICLE 1:

βAPPintracellulardomaincontrolsmitochondrialfunctionbymodulatingPink-1transcriptionin cells and in Alzheimer micemodels

Thomas Goiran, Eric Duplan, Mounia Chami, Alexandre Bourgeois, Inger Lauritzen, Wejdane Elmanaa, Julie Dunys, Han you, Vuk Stambolic, Maria-Grazia Biféri, Martine Barkats, Sanjay Pimplikar, Nicolas Sergeant, Morvane Colin, Vanessa Morais, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Frédéric Checler and Cristine Alves Da Costa.

I. Introduction

L'étiologie de la MA est associée à des altérations des fonctions mitochondriales. Ainsi, dans les cas familiaux et sporadiques de MA, une accumulation précoce de structures anormales à été mise en évidence (Baloyannis, 2006; Gibson et al., 2010). L'exacerbation de l'autophagie neuronale peut donc être considérée comme un stigmate anatomique des pathologies neurodégénératives (Son et al., 2012). Cependant, peu de travaux décrivent les mécanismes précis responsables de ces altérations.

PINK1, conjointement avec la parkine, contrôle aussi bien la dynamique mitochondriale que la mitophagie (Yu et al., 2011). PINK1 est une kinase, induite par PTEN, dont l'expression est altérée dans les régions particulièrement affectées dans la MA (Sonoda et al., 2010). Globalement, l'altération de l'homéostasie de PTEN-PINK1 peut déboucher sur plusieurs défauts caractérisant la MA.

Il est remarquable que les PS, qui constituent le corps catalytique de la γ sécrétase, l'enzyme responsable de l'ultime coupure de l'A β (De Strooper et al., 1998; Wolfe and Haass, 2001) et de sa contrepartie C-Terminale, l'AICD (Pardossi-Piquard and Checler, 2012), régulent le niveau de PTEN (Zhang et al., 2008a). Cette observation nous a conduit à poser la question de l'implication des PS dans la régulation de PINK1 et de ses conséquences fonctionnelles.

II. Résultats

Nous avons établi que PS1 contrôle PINK1 par l'intermédiaire de son activité γ-sécrétase indépendamment de PTEN. Nous montrons que l'AICD, contrôle la transactivation et l'expression de PINK1 par l'intermédiaire de FOXO3a, un des principaux modulateurs de l'autophagie. Ce contrôle d'AICD sur PINK1 influence ses fonctions mitochondriales et

Thomas Goiran, Eric Duplan, Mounia Chami, Alexandre Bourgeois, Inger Lauritzen, Wejdane Elmanaa, Julie Dunys, Han you, Vuk Stambolic, Maria-Grazia Biféri, Martine Barkats, Sanjay Pimplikar, Nicolas

Sergeant, Morvane Colin, Vanessa Morais, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Frédéric Checler and Cristine Alves Da Costa.

Alzheimer mice models

Alzheimer mice models

Thomas Goiran, Eric Duplan, Mounia Chami, Alexandre Bourgeois, Inger Lauritzen, Wejdane Elmanaa, Julie Dunys, Han you, Vuk Stambolic, Maria-Grazia Biféri, Martine Barkats, Sanjay Pimplikar, Nicolas Sergeant, Morvane Colin, Vanessa Morais, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Frédéric Checler and Cristine Alves Da Costa.

mitophagiques. Finalement nous démontrons que la parkine, via la transactivation du promoteur de PS1 (Duplan et al., 2013), contrôle les niveaux de PINK1, toujours indépendamment de PTEN. Notre étude délimite pour la première fois une cascade moléculaire liant PS1 et PINK1. En outre, nous révélons un dialogue dépendant des PS entre la parkine et PINK1. C'est la première démonstration d'une implication de la parkine en amont de PINK1. De manière hypothétique, cette boucle de rétrocontrôle pourrait correspondre à un mécanisme de contrôle de la santé mitochondriale, un paramètre systématiquement altéré dans les maladies neurodégénératives.

βAPP intracellular domain controls mitochondrial function by modulating Pink-1 transcription in cells and in Alzheimer mice models

Thomas Goiran¹, Eric Duplan¹, Mounia Chami¹, Alexandre Bourgeois¹, Wejdane El Manaa¹, Lila Rouland¹, Julie Dunys¹, Inger Lauritzen¹ Han You², Vuk Stambolic³, Maria-Grazia Biféri⁴, Martine Barkats⁴, Sanjay W Pimplikar⁵, Nicolas Sergeant⁶, Morvane Colin⁶, Vanessa A. Morais⁷, Raphaelle Pardossi-Piquard¹, Frédéric Checler¹ and Cristine Alves da Costa^{1*}

1- Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS/UMR7275, IPMC, team labeled "Laboratory of Excellence (LABEX) Distalz", 660 route des Lucioles, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

2- State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, Innovation Center for Cell Signaling network, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China.

3-Princess Margaret Center, University Health Network and Department of Medical Biophysics, University of Toronto, 101 College Street, Suite 13-313, Toronto, M5G 1L7, Ontario, Canada.

4- Center of Research on Myology, FRE 3617 Centre National de la Recherche Scientifique, UMRS 974 INSERM, French Institute of Myology, Pierre and Marie Curie University Paris, France.

5- Dept. Neurosciences, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland OH, USA.

6- Inserm, UMR-S 1172, Alzheimer &Taopathies, Jean-Pierre Aubert Research Centre, Faculté de Médecine, IMPRT, F-59045, Lille, France

7- Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

* Correspondence should be addressed to Cristine Alves da Costa, Tel: 33 4 93953457, Fax: 33 4 93953408; email: <u>acosta@ipmc.cnrs.fr</u>.

Running title: Pink-1 regulation by presenilins

Keywords: Pink-1; presenilins; AICD; FOXO3a; γ -secretase; parkin, 3xTgAD mice; mitochondrial dysfunction, mitophagy.

Abstract number of words: 224

Article body number of words: 3999 words

Figures: 7

Supplementary information: a PDF containing part of the Methods, additional references

linked to methods and six supplementary figures and their legends.

Thomas Goiran et al.

Abstract

Background

Mitophagy and mitochondrial dynamics alterations are two major hallmarks of neurodegenerative diseases. Dysfunctional mitochondria accumulate in Alzheimer's disease-affected brains by yet unexplained mechanisms.

Methods

We combined cell biology, molecular biology and pharmacological approaches to unravel a novel molecular pathway by which presenilins control Pink-1 expression and transcription. *In vivo* approaches were carried out on various transgenic and knockout animals as well as in AAV-infected mice. Functional read-out and mitochondrial physiology (mitochondrial potential, $\Delta\psi$ mit) were assessed by combined procedures including Flow cytometry, live imaging analysis and immunohistochemistry.

Results

We show that presenilins 1 and 2 trigger opposite effects on promoter transactivation, mRNA and protein expression of PTEN-induced kinase 1 (Pink-1). This control is linked to γ secretase activity and β APP but independent of PTEN. We show that APP Intracellular Domain (AICD) accounts for presenilin-dependent phenotype and up-regulates Pink-1 transactivation in cells as well as *in vivo* in a FOXO3a-dependent manner. Interestingly, the modulation of γ -secretase activity or AICD expression impacts Pink-1-related control of mitophagy and mitochondrial dynamics. Finally, we show that parkin acts upstream of presenilins to control Pink-1 promoter transactivation and protein expression.

Conclusions

Overall, we delineate a molecular cascade presenilins-AICD-FOXO3a linking Parkin to Pink-1. Our study demonstrates an AICD-mediated Pink-1-dependent control of mitochondrial

physiology by presenilins. Furthermore, it unravels a parkin-Pink-1 feedback loop controlling mitochondrial physiology that could be disrupted in neurodegenerative conditions.

Introduction

It arose recently that besides macroscopic lesions characterizing specific subsets of neurodegenerative diseases, mitochondrial function appears consistently affected in brain diseases (1, 2). Indeed, mitochondrial deficits are now considered as a major hallmark in Alzheimer's disease (AD) (3). In both familial and sporadic AD cases, early accumulation of structurally abnormal mitochondria has been evidenced (4, 5) and such defects also stand in animal models of AD (6). Thus, β APP (β -amyloid precursor protein) transgenic mice-derived neurons display drastically altered mitochondrial dynamics (6, 7).

Exacerbated neuronal autophagy/mitophagy also corresponds to a consistent anatomical stigma in neurodegenerative diseases (2). In AD-affected brains, electron microscopy unraveled neuronal accumulation of autophagic vacuoles and impairment of autophagosomes maturation that ultimately yield A β overload (8). While both mitochondrial dynamics and mitophagy could well contribute to early phase of AD-linked neurodegeneration, little is known concerning the mechanistic defects that could account for such alterations.

Pink-1 controls both mitochondrial dynamics and mitophagy by selectively enhancing mitochondrial fission (9) and by recruiting parkin (PK) to damaged mitochondria (10), respectively. Pink-1 is a PTEN-induced putative kinase 1 (11) and it is noteworthy that PTEN expression is altered in AD brains in a region specific manner (12) and appears involved in the synaptic plasticity and cognition in AD mice models (13). Strikingly, immunological detection also revealed Pink-1 expression in senile plaques (14). Overall, alteration of PTEN-Pink-1 homeostasis could well account for some of the defects taking place in AD.

It is remarkable that presenilins (PS1 and PS2), that constitute the catalytic core of γ secretase responsible for the ultimate cleavage yielding amyloid β (15, 16) and its C-terminal

counterpart AICD (APP IntraCellular Domain) (17) from β APP, regulate the level of PTEN (18). This led us to question whether PS could act as upstream regulators of Pink-1 and of its associated functions. Here we show that PS1 controls Pink-1 by a γ -secretase- and β APP-dependent but PTEN-independent mechanism. We show that AICD, that was shown to behave as a transcription factor (19-21), indeed controls Pink-1 transactivation and expression in a FOXO3a-dependent process. AICD-mediated control of Pink-1 influences its mitochondrial and mitophagic functions. Finally, we demonstrate that PK, which acts as a transactivator of PS1 promoter (22), controls Pink-1 in a fully PS1-dependent but PTEN-independent manner. Thus, our study delineates for the first time, a molecular cascade linking PS1 and Pink-1. Furthermore, we reveal a PS-dependent molecular link between PK and Pink-1 that could be part of a feedback loop responsible for their cellular homeostasis and mitochondrial health that could be altered in neurodegenerative condition.

Methods and Materials

Cellular and animal models, promoter activities assay, mRNA analysis and description of constructs are provided in supplementary information.

Drugs description and administration ex-vivo.

The mitochondrial uncoupler CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) and LY-294,002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride) (23) (Millipore-Sigma, USA) were incubated at 10 μ M for 6h or 16h (respectively) as previously described (24). DFK-167 (MP Biomedical, USA) was applied on HEK293 and MEF cells at 50 μ M for 15h. ELND006 (D6) was kindly provided by Elan Pharmaceuticals (USA) and used in both *ex-vivo* and *in vivo* (see below in 3xTgAD and *in vivo* drug treatment section) studies (25). In *ex-vivo* experiences, HEK293 and MEF cells were treated for 15h with D6 (5 μ M).

Cellular and mouse brain sample preparation and Western blot analysis.

Western blot analysis of cellular and mouse brain samples were performed by standard procedures and described in supplemental information.

3xTgAD mice and *in vivo* drug treatment.

3xTgAD (harboring PS1_{M146V}, β APP_{swe}, and TAU_{P301L} transgenes) and non-transgenic (wild-type) mice (26) were housed with a 12:12h light/dark cycle and were given free access to food and water. All experimental procedures were in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and local French legislation. Two groups of 24 wild-type males (129/C57BL6) and 25 3xTgAD males were used. Mice was treated daily during 10 days with either vehicle or with D6 (30mg/kg, Elan

Pharmaceuticals, USA) (25) *via* oral gavage (27). Animals were sacrificed six hours after the last administration. Dissected hippocampi were either submerged for 2 days in RNAlater RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) for qPCR mRNA analysis or reserved for membrane fractions preparation devoted to γ -secretase activity measurement (28) and western-blot analysis of AICD and β APP C-terminal fragments were performed as described in supplementary information methods.

AAV-NLS-AICD production and mice injection.

Virus production and mice injection were performed according to previously described protocols (27, 29) and resumed in supplemental information.

Mitochondrial potential disruption analysis.

Mitochondrial potential ($\Delta \psi_{mit}$) was accessed using live imaging and Flow Cytometry analysis of TMRM (tetramethyl-rhodamine-methyl-ester) probe as detailed in supplemental information.

Immunohistochemistry.

Immunohistochemical analyses of mice brain slices are described in supplemental information.

Results

Presenilin 1 and Presenilin 2 differently modulate Pink-1 transcription in a PTENindependent manner.

We have examined the ability of presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2) to modulate Pink-1 levels at both transcriptional and post-transcriptional levels. We show that Pink-1 expression is poorly detectable in mock-transfected HEK293 and could be enhanced upon CCCP treatment (Figure 1A,B) in agreement with the well-established stabilizing effect of this uncoupling agent on Pink-1 protein (10). Stable expression of PS1 drastically enhances Pink-1 expression while PS2 reduces Pink-1 to levels below CCCP-treated mock-transfected cells (Figure 1A,B). Interestingly, PS1 and PS2 also trigger similar opposite effects on Pink-1 promoter transactivation (Figure 1C) and mRNA levels (Figure 1D).

PS regulate cellular levels of PTEN (18), a tumor suppressor thought to transcriptionally transactivate Pink-1(11). We therefore questioned whether a direct PS-PTEN-Pink-1 cascade could mechanistically account for PS-mediated modulation of Pink-1 or whether alternative pathways could be envisioned. As expected, PS1 overexpression enhanced PTEN protein (Figure S1A) and mRNA (Figure S1C) expressions and transactivates its promoter (Figure S1B) while depletion of endogenous PS1 triggers the opposite phenotype (Figure S1D,E). Noteworthy, PS2 expression lowers PTEN protein levels, promoter activity and mRNA levels (Figure S1A-C), a feature reminiscent of that observed for PS2-mediated control of Pink-1 (see Figure 1A-D). As expected, we also observed a drastic reduction of Pink-1 mRNA levels and promoter activation in PTEN-deficient fibroblasts (Figure 1E,F). Altogether, these data show that fibroblasts display canonical cellular responses linking PS and PTEN on one hand and PTEN and Pink-1 on the other hand. However, we show that PS-mediated control of Pink-1 remained unaltered by PTEN gene invalidation (Figure 1G),

indicating that PS likely control Pink-1 transcription by alternative PTEN-independent pathways.

In order to rule out a possible artifactual influence of PS on Pink-1 due to the overexpression procedure, we examined the contribution of endogenous PS on Pink-1 transactivation and mRNA levels. PS1 gene depletion lowers Pink-1 promoter transactivation (Figure 1H) and mRNA levels (Figure 1I) while PS2 gene ablation led to barely detectable and not statistically significant effects (Figure H,I). The discrepancy between PS2 overexpression and depletion data could be explained by the previously described interplay between PS1 and PS2 (30). Thus, we showed that PS2 lowers PS1 expression. Thus, PS2 overexpression via reduction of PS1 triggers Pink-1 diminution, while PS2 depletion remains biologically inert. This suggests a dominant role of PS1 over PS2 in the control of Pink-1. Indeed, invalidation of both PS1 and PS2 lowers both Pink-1 promoter activation (Figure 1J) and mRNA levels (Figure 1K), a phenotype similar to the one observed with PS1 depletion only (Figure 1H,I). In agreement, in a double PS1/2 knockout background, PS1 only rescues the Pink-1 activation of its promoter (Figure 1L). Overall, these data show that PS1 is involved in the transcriptional activation of Pink-1 by a PTEN-independent mechanism.

Presenilin 1-mediated control of Pink-1 is dependent of its catalytic activity.

Presenilins are pleiotropic proteins (31) but act as the catalytic core of γ -secretase, the enzymatic complex yielding A β (15). We examined by pharmacological and mutational approaches, the consequences of the blockade of PS-mediated catalysis on Pink-1. Mutation on the aspartyl residue in position 257 of PS1 abolishes its activity (32) and reduced Pink-1 protein expression (Figure 2A), promoter activation (Figure 2B) and mRNA levels (Figure 2C). Furthermore, inhibition of γ -secretase by two distinct inhibitors (ELND006, (D6, (25)) and DFK167 (DFK, (33)) led to similar reductions of Pink-1 protein expression (Figure 2D).

We examined whether pharmacological blockade of γ -secretase could also influence Pink-1 mRNA levels in vivo, in triple transgenic (3xTgAD harboring PS1_{M146V}, βAPP_{swe} and P301L transgenes) mice model of Alzheimer's disease (26). Interestingly, 3xTgAD mice exhibit increased Pink-1 mRNA levels at 3 months of age, i.e when C99 (the β-secretase-derived fragment of β APP) accumulates in absence of detectable A β (34), and steadily till 12 monthold (Figure S2A). Then, we examined the influence of pharmacological blockade of γ secretase by D6 on Pink-1 mRNA levels. First, we confirmed that D6 treatment abolished γ secretase activity as illustrated by complete inhibition of AB and AICD in vitro production (Figure S3A), as described (34). As expected, D6 highly enhanced the expression of CTF APP fragments C83 and C99 but also drastically reduces recovery of AICD in treated 3xTg-AD brains (Figure S3B). It is of note that AICD expression was higher in 3xTg-AD mice than in control wild-type mice (Figure S3B). Of importance, D6 did not affect Pink-1 mRNA levels in control mice and restored Pink-1 mRNA expression to control mice levels in 3xTgAD mice (Figure 2E). It is noteworthy that PS-dependent control of PTEN (see above) was independent of its γ -secretase activity (18) and hence, support the dichotomy between γ secretase-independent PS1-related effects on PTEN and y-secretase-dependent effect on Pink-1. Overall, our data indicate that γ -secretase activity accounts for PS1-mediated control of Pink-1 both in vitro and in vivo.

Presenilin-mediated control of Pink-1 is affected by β APP modulation.

Besides β APP, which originally allowed characterization of PS catalytic function (15), numerous proteins were delineated as additional γ -secretase substrates (17). Thus, we examined the contribution of β APP to PS1-dependent control of Pink-1 in human cells. Wildtype β APP overexpression augmented Pink-1 protein (Figure 3A) and mRNA (Figure 3C)

expressions and led to enhanced Pink-1 promoter transactivation (Figure 3B). Interestingly, these augmentations were further enhanced in cells expressing the Swedish mutated β APP (Figure S4A-C). Conversely, MEF cells that naturally lack endogenous β APP family member APLP1 and that are genetically invalidated for both β APP and its additional family member APLP2 (thus considered as triple knockout (tko) in Figure 3) show reduced Pink-1 promoter activity (Figure 3D) and mRNA levels (Figure 3E). Of importance, PS1 overexpression enhances Pink-1 promoter transactivation in wild-type (CT) but not in tko cells (Figure 3F). Finally, D6 reduces Pink-1 promoter activation and mRNA levels in wild-type (CT) but not in tko fibroblasts (Figure 3G,H). Altogether, the above data demonstrate that PS1-mediated and γ -secretase-linked control of Pink-1 occurs via the γ -secretase cleavage of endogenous β APP.

AICD controls cellular Pink-1 transcription in a FOXO3a-dependent manner.

Both A β and AICD harbor transcription factor properties (35-37). However, several lines of reasoning and independent data led us to consider AICD as the main mediator of PS1-linked control of Pink-1. Firstly, AICD is a transcription factor (17) that is mainly generated in the amyloidogenic pathway from its precursor C99 by γ -secretase (38-40). Secondly, expression of β APP harboring the Swedish mutation thought to potentiate BACE1-mediated formation of C99 increases Pink-1 promoter transactivation and mRNA levels (Figure S4A-C). Thirdly, APP¢, the APP fragment that undergoes β/γ -secretases cleavages, thereby leading A β (41), but which lacks AICD did not modulate Pink-1 expression (Figure S4D). Fourth, we previously designed 2xTgAD mice that were derived from intercrossing of the F1 progeny of 3xTgAD with wild-type mice (34). At late stages, 3xTgAD and 2xTg-AD mice accumulate C99 and AICD to similar extents while A β is present only at barely detectable levels in 2xTg (34) compared to 3xTgAD. Interestingly, 12 month-old 2xTg-AD and 3xTg-AD mice display similar increases of Pink-1 mRNA levels (Figure S2B). Fifth, *in vivo* inhibitor-mediated full

blockade of γ -secretase in 3xTg-AD mice brain (Figure S3A) drastically reduces AICD expression (Figure S3B) and concomitantly restored Pink-1 mRNA levels to control values (Figure 2E).

Based on these observations, we therefore examined the putative influence of AICD on Pink-1. We used an AICD construct harboring a nuclear localization sequence (nls) aimed at potentiating its targeting to the nucleus. Figure 4 shows that AICD^{nls} (AICD) overexpression increases Pink-1 protein expression (Figure 4A), promoter transactivation (Figure 4B) and mRNA levels (Figure 4C). Figure 4D shows that AICD overexpression also increases Pink-1 promoter transactivation in tko fibroblasts.

We mapped the Pink-1 promoter region involved in its AICD-mediated transactivation. As expected, AICD increased transactivation of full-length Pink-1 promoter (compare black and white FL bars in Figure 4E). 5' deletions data indicated that deletion of the -2055-1354 Pink-1 promoter region fully abolished AICD-mediated increase in Pink-1 promoter activation (compare FL and 1.3 constructs in Figure 4E). The close examination of this region allowed us to identify two Forkhead box, subgroup O3a (FOXO3a) responsive elements (F1 and F2) located within this functionally relevant 5' region of Pink-1 promoter (Figure 4F, upper scheme). Our interest for FOXO3a was motivated by two independent observations. Firstly, FOXO3a activation was previously shown to up-regulate Pink-1 transcription in both mouse and human cells (42) and, secondly, Wang and Colleagues recently demonstrated a physical and functional interaction between FOXO3a and AICD (43). In this context, we postulated that FOXO3a and AICD could functionally interact to control Pink-1 transcription. Thus, we examined the influence of the mutation of these FOXO3a responsive elements on the AICD-mediated control of Pink-1. Our data indicate that amongst the two sites, only the F1 responsive element fully abolishes AICD-mediated transactivation of Pink-1 promoter (Figure 4F, lower right panel). This data was corroborated by experiments

aimed at pharmacologically blocking FOXO3a with LY-294,002 (compare gray bars, Figure 4G) that show that this inhibitor fully prevents AICD-induced increase in Pink-1 promoter activity. Overall, our data unravel a linear molecular cascade linking PS1, β APP/AICD, FOXO3a and Pink-1.

Parkin controls Pink-1 transcription in a presenilin-dependent and PTEN-independent pathway.

We previously demonstrated that besides its well-characterized ubiquitin-ligase activity (44), PK also behaved as a transcription factor (45). Amongst its various targets, we showed that PK directly up-regulated PS1 and down-regulated PS2 promoter transactivations and protein expressions (22). These opposite effects of PK on PS, that were strikingly similar to the opposite effects of PS1 and PS2 on Pink-1 transactivation (see Figure 1) led us to question whether PK could modulate Pink-1 transcription via PS1. Five lines of direct and indirect evidences support this hypothesis. Firstly, PK overexpression increases Pink-1 promoter transactivation and mRNA levels (Figure 5A,B); secondly, deletion of endogenous PK reduces Pink-1 transcription and mRNA expression ex-vivo (Figure 5C,D); thirdly, Pink-1 protein and mRNA expression were lowered in the brain of *parkin* null mice (Figure 5E,F); fourth, PK-induced increment in Pink-1 promoter activation was fully abolished by PS1 and PS2 ($PS^{-/-}$) gene invalidation (Figure 5G); fifth, PK ability to up-regulate Pink-1 promoter transactivation remains unaffected by PTEN depletion (Figure 5H). While the control of PK by Pink-1 has been consistently documented (46, 47), our data demonstrate for the first time, a reciprocal pathway where PK acts upstream of a PS1/AICD-dependent cellular cascade linking PK to Pink-1.

AICD modulates mitochondrial physiology in a Pink-1-dependent manner.

If the above cascade is true, one anticipates an AICD-associated modulation of Pink-1mediated functions. Pink-1 has been consistently involved in the control of mitophagy and mitochondrial dynamics (9).

Mitochondrial membrane potential ($\Delta \Psi m$) directly reflects mitochondrial health and can be classically measured to follow mitophagy. First, we used TMRM as an indicator of $\Delta \Psi m$ alterations to analyze the impact of endogenous Pink-1 reduction on mitochondrial function. As expected (48), both confocal (Figure 6A,B) and FACS (Figure 6C) analyses indicate that shRNA-induced Pink-1 knockdown in SH-SY5Y cells (Pink-1^{KD}) or full genetic depletion (Pink-1^{-/-}) in fibroblasts (Figure S5) significantly reduced mitochondrial membrane potential (compare black and white CT bars in Figure 6B,C and Figure S5B). Noteworthy, the D6 reduced TMRM fluorescence in wild-type cells, a phenotype abolished by endogenous Pink-1 depletion in both Pink-1^{KD} and Pink-1^{-/-} cells (Figures 6B,C and S5, respectively). This effect was confirmed by use of another γ -secretase inhibitor DFK167, in Pink^{-/-} fibroblasts (Figure S5). This set of data clearly indicates that Pink-1-mediated control of mitophagy/autophagy is modulated by γ -secretase-linked events in these cells. In order to directly link this function to AICD, we examined the influence of AICD^{nls} on LC3II and p62, two classical markers of autophagosomes formation and autophagic degradation, respectively. Firstly, we confirmed that reduction of Pink-1 in Pink-1^{KD} cells (Figure S6A-C) modulated p62 and LC3II expressions in an opposite manner in stress conditions (CCCP, Figure S6D-F) suggesting a decreased autophagic process as previously described (49, 50). Interestingly, AICD^{nls} overexpression increased LC3-II (Figure 6D,E compare black bars) and reduced p62 (Figure 6D.F compare black bars) levels in wild-type SH-SY5Y cells but not in Pink-1^{KD} cells (Figure 6D-F, compare white bars), indicating that AICD^{nls} promotes a pro-autophagic phenotype that is fully dependent of endogenous Pink-1. It is worth noting that FOXO3a controls autophagy via its transcription factor properties (51, 52). Thus, it is not excluded that
AICD/FOXO3a interaction may alter expressions of additional genes involved in nonselective autophagy. To foster the implication of AICD in mitophagy control, we have analyzed its impact on the levels of TIM23 and TOM20, two reliable markers of mitochondrial mass used to follow mitophagy process (53, 54). First, we confirmed that Pink-1 depletion triggers accumulation of TIM23 (Figure S6D,G) and TOM20 (compare white bars in Figure S6D,H) levels in CCCP conditions. Interestingly, AICD^{nls} overexpression decreased TIM23 (Figure 6D,G compare black bars) and TOM20 (Figure 6D,H compare black bars) levels in wild-type SH-SY5Y cells but not in Pink-1^{KD} cells (Figure 6D and compare white bars in Figure 6G,H).

Finally, mitochondrial dynamics are mainly supported by fusion/fission processes that can be followed by canonical markers such as mitofusin 2 (MFN2) and dynamin-like 1 protein (DRP1), respectively (1). We confirmed that Pink-1 knockdown leads to accumulation of MFN2 and DRP1 protein levels (Figure S6I-K) probably due to the decrease of Pink-1mediated PK recruitment and E3-ligase activity (55, 56). Again, conversely, AICD^{nls} expression reduces DRP1 and MFN2 expressions in Pink-1 control cells (Figure 6D,I,J), a phenotype fully prevented by Pink-1 knockdown (Figure 6D,I,J). The above data indicate that both γ -secretase inhibition and AICD^{nls} expression modulate mitophagy and mitochondrial dynamics in a Pink-1-dependent manner, thereby confirming AICD as a potent modulator of Pink-1-mediated phenotypes.

AICD modulates Pink-1 transcription in vivo.

In order to reinforce our cell biology approaches, we examined whether AICD could modulate Pink-1 protein and mRNA levels *in vivo* in mouse brain. Firstly, we used an adenoviral approach to express AICD^{nls} in neonatal mouse brain. As illustrated in Figure 7A, AICD^{nls} is expressed in hippocampal regions (1 month-old) and appears clearly associated

with nuclear DAPI labeling (Figure 7A, lower panels) indicating its efficient nuclear translocation, *in vivo*. AICD^{nls} increased expressions of Pink-1 protein (Figure 7B) and mRNA levels of Pink-1 and of neprilysin, a canonical AICD transcriptional target (20) (Figure 7C). Secondly, we analyzed the impact of AICD in a transgenic mice model stably overexpressing AICD (57, 58). As previously described (59), AICD-Tg mice display enhanced neprilysin mRNA levels (Figure 7E) and increased Pink-1 protein expression and mRNA levels (Figures 7D,E respectively). Altogether, these two independent mice models of AICD expression concur to conclude that AICD acts as a genuine modulator of Pink-1 promoter transactivation in cells and *in vivo*.

Discussion

Specific histological lesions serve as anatomical signatures to characterize subsets of neurodegenerative diseases. However, additional dysfunctions such as protein aggregation (60, 61), misfolding and more recently spreading (62), proteasome dysfunction (63), ER stress and UPR activation (64) as well as other vital cellular processes are also seen as common denominators of brain diseases. It has also been suggested that mitochondrial dysfunctions could well underlie at least part of neurodegenerative processes. Thus, disruption of mitochondrial dynamics reflected by altered balance between fission and fusion processes or inefficient mitochondria quality control by mitophagy have been consistently reported (1, 2). Such defects have been described in Alzheimer's disease (65) but the molecular mechanisms underlying these observations remained poorly understood.

Pink-1 is a kinase that harbors a dual mitochondrial and cytosolic localization. Amongst Pink-1-related functions, its involvement in the control of mitochondria morphology was first documented (66), then Pink-1 was shown to control mitophagy process (49). Interestingly, Pink-1-like immunoreactivity colocalized with senile plaques in AD-affected brains (67). These data led us to examine the mechanisms by which Pink-1 could account for the mitochondrial dynamics and mitophagy alterations taking place in AD.

We delineated a molecular cascade linking presenilin 1 (PS1) and Pink-1. Thus, overexpression/depletion of PS1 increases/lowers Pink-1 promoter transactivation, mRNA and protein expressions. Cellular biology and pharmacological approaches as well as *in vivo* models indicate that PS1-mediated control of Pink-1 involved γ -secretase cleavage of β APP. Further, we identified AICD as the cellular mediator able to modulate Pink-1 transactivation in cells as well as *in vivo*, in two distinct models of AICD-expressing mice. Of note, AICD modulates Pink-1-associated changes in mitochondrial membrane potential and autophagy/mitophagy player's expression. Importantly, we established that PS1-mediated

control of Pink-1 was independent of PTEN. This data agrees well with a prior study showing that conversely to PS1-mediated control of Pink-1, PS1 modulation of PTEN was independent of γ -secretase (18). Thus, PS1-dependent modulation of Pink-1 and PTEN appear either linked or independent of its catalytic function.

AICD is a transcription factor able to modulate transcription of a number of genes (17, 21, 68). Such function is often supported by AICD ability to interact with co-factors/nuclear modulators (17, 68). Here, we demonstrated that AICD-associated control of Pink-1 involved FOXO3a since deletion of FOXO3a responsive elements on Pink-1 promoter fully abolished AICD-induced modulation of its transcription. These data agree well with a previous study showing that AICD and FOXO3a interacted physically and translocated in the nucleus to ultimately control cell death (43). Furthermore, FOXO3a regulated Pink-1 transcription in human cells (42). This adds to the growing evidence that epigenetic factors could well contribute to aging and dementia (69, 70).

It is interesting to note that two previous studies indirectly suggested a putative functional link between AICD and Pink-1 in the control of mitochondrial function. Thus, the mRNA levels of PGC-1 α , a mitochondrial co-activator driving the expression of various mitochondrial proteins, were lowered by PS1 pathogenic mutations and up-regulated by AICD (71) while Pink-1 also increased PGC-1 α -linked regulation of mitochondrial oxidation (72).

Recent evidence indicated that Pink-1 controls mitochondrial fragmentation in hippocampal neurons (9) and recruits PK to damaged mitochondria to trigger mitophagy (10). In both cases, Pink-1 has been considered as an effector acting upstream of PK. Our study demonstrates that PK could also occur upstream of Pink-1 to regulate its function. Initially, this hypothesis was based on our previous study showing that PK could behave as a direct transactivator that up- or down-regulated PS1 and PS2 promoter transactivation, respectively

(22). This opposite effect of PK on PS1 and PS2 was strikingly reminiscent of PS1/PS2mediated effect on Pink-1 (see Figure 1). Interestingly, we were able to show that PK overexpression or deletion increased or lowered Pink-1 promoter transactivation and mRNA levels, respectively and secondly, that PK-mediated control of Pink-1 was fully abolished by PS depletion and remains independent of PTEN. Thus, we have evidenced a functional interplay between PK and Pink-1 and unraveled a key role of PS1/ γ -secretase-derived AICD fragment in such regulation (see Figure 7F).

The above-described cascade and feedback loop could ensure protein homeostasis in physiological conditions and adjust cellular responses to control mitochondrial physiology in case of cellular stresses or challenges. This interplay could be of importance in neurodegenerative diseases. Thus, we showed that several PK mutations responsible for familial Parkinson's disease abolish its transcriptional function (45). In these cases, lowering PS1 could ultimately drive reduction of Pink-1 and thereby, compromise the adaptive response to mitochondrial dysfunction. On the other hand, in both sporadic and most familial cases of AD, AICD expression is likely increased due to either lower degradation rate linked to reduced expression of its degrading enzyme Insulin-degrading enzyme (73) or increased production triggered by APP or PS1 mutations (74). This could explain the macroscopic observation of an increased expression of Pink-1 in senile plaques and reflect a cellular adaptation response to circumscribe neurodegenerative process. Overall, our study enlightens a novel cellular cascade and delineates potential targets for therapeutic intervention.

Acknowledgements

The authors sincerely thank Drs. A.Y Abramov, O. Corti, T. Dawson, B. de Strooper, F. LaFerla, and U. Muller, and for providing valuable cellular and animal models and Drs. G. Thinakaran and Elan Pharmaceutics for providing the anti-PS antibody and γ -secretase inhibitor, D6, respectively. This work was supported by the "Conseil départemental des Alpes Maritimes" and the Foundation Claude Pompidou. This work has been developed and supported through the LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to ALZheimer's disease and the Hospital University Federation (FHU) OncoAge. Thomas Goiran is funded by the Ligue Contre le Cancer.

Conflict of interest: The authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

References

1. Chen H, Chan DC (2009): Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*. 18:R169-176.

2. Son JH, Shim JH, Kim KH, Ha JY, Han JY (2012): Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Experimental & molecular medicine*. 44:89-98.

3. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM (2014): The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta*. 1842:1219-1231.

4. Gibson GE, Starkov A, Blass JP, Ratan RR, Beal MF (2010): Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1802:122-134.

5. Baloyannis SJ (2006): Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 9:119-126.

6. Trushina E, Nemutlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. (2012): Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. *PLoS One*. 7:e32737.

7. Calkins MJ, Manczak M, Mao P, Shirendeb U, Reddy PH (2011): Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 20:4515-4529.

8. Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, et al. (2008): Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 28:6926-6937.

9. Yu W, Sun Y, Guo S, Lu B (2011): The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Hum Mol Genet*. 20:3227-3240.

10. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, Gautier CA, et al. (2010): PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol*. 189:211-221.

11. Unoki M, Nakamura Y (2001): Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene*. 20:4457-4465.

12. Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, et al. (2010): Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neurosci Lett*. 471:20-24.

13. Knafo S, Sanchez-Puelles C, Palomer E, Delgado I, Draffin JE, Mingo J, et al. (2016):
PTEN recruitment controls synaptic and cognitive function in Alzheimer's models. *Nat Neurosci.* 19:443-453.

14. Wilhelmus MM, van der Pol SM, Jansen Q, Witte ME, van der Valk P, Rozemuller AJ, et al. (2011): Association of Parkinson disease-related protein PINK1 with Alzheimer disease and multiple sclerosis brain lesions. *Free Radic Biol Med.* 50:469-476.

15. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, et al. (1998): Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 391:387-390.

16. Wolfe MS, Haass C (2001): The Role of presenilins in gamma-secretase activity. *J Biol Chem.* 276:5413-5416.

17. Pardossi-Piquard R, Checler F (2012): The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem.* 120 (Suppl. 1):109-124.

18. Zhang H, Liu R, Wang R, Hong S, Xu H, Zhang YW (2008): Presenilins regulate the cellular level of the tumor suppressor PTEN. *Neurobiol Aging*. 29:653-660.

19. Gao Y, Pimplikar SW (2001): The γ -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:14979-14984.

20. Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, et al. (2005): Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron*. 46:541-554.

21. Konietzko U (2012): AICD nuclear signaling and its possible contribution to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 9:200-216.

22. Duplan E, Sevalle J, Viotti J, Goiran T, Bauer C, Renbaum P, et al. (2013): Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription. *J Mol Cell Biol*. 5:132-142.

23. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK (2011): Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1813:1978-1986.

24. Giaime E, Sunyach C, Druon C, Scarzello S, Robert G, Grosso S, et al. (2010): Loss of function of DJ-1 triggered by Parkinson's disease-associated mutation is due to proteolytic resistance to caspase-6. *Cell Death Differ*. 17:158-169.

25. Probst G, Aubele DL, Bowers S, Dressen D, Garofalo AW, Hom RK, et al. (2013): Discovery of (R)-4-cyclopropyl-7,8-difluoro-5-(4-(trifluoromethyl)phenylsulfonyl)-4,5-dihydro- 1H-pyrazolo[4,3-c]quinoline (ELND006) and (R)-4-cyclopropyl-8-fluoro-5-(6-(trifluoromethyl)pyridin-3-ylsulfonyl)-4,5-dihydr o-2H-pyrazolo[4,3-c]quinoline (ELND007): metabolically stable gamma-secretase Inhibitors that selectively inhibit the production of amyloid-beta over Notch. *J Med Chem.* 56:5261-5274.

26. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy G, Golde TE, Kayed R, et al. (2003): Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Ab and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39:409-421.

27. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M, et al. (2016): Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol.*

28. Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournie-Zaluski MC, Roques B, Checler F (2009): Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem*. 109:248-256.

29. Benkhelifa-Ziyyat S, Besse A, Roda M, Duque S, Astord S, Carcenac R, et al. (2013): Intramuscular scAAV9-SMN injection mediates widespread gene delivery to the spinal cord and decreases disease severity in SMA mice. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 21:282-290.

30. Alves da Costa C, Paitel E, Mattson MP, Amson R, Telerman A, Ancolio K, et al. (2002): Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:4043-4048.

31. Checler F (1999): Presenilins: multifunctional proteins involved in Alzheimer's disease pathology. *Iubmb LIFE*. 48:33-39.

32. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999): Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature*. 398:513-517.

33. Wolfe MS, Citron M, Diehl TS, Xia W, Donkor IO, Selkoe DJ (1998): A substratebased difluoro ketone selectively inhibits Alzheimer's gamma-secretase activity. *J Med Chem*. 41:6-9.

34. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, et al. (2012): The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a

key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. J Neurosci. 32:16243-16255a.

35. Bailey JA, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK (2011): Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid beta-peptide interacting domain (AbetaID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene*. 488:13-22.

36. Maloney B, Lahiri DK (2011): The Alzheimer's amyloid beta-peptide (Abeta) binds a specific DNA Abeta-interacting domain (AbetaID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: characterizing a new regulatory motif. *Gene*. 488:1-12.

37. Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, et al. (2005): Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Faseb J*. 19:255-257.

38. Flammang B, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Debayle D, Dabert-Gay AS, Thevenet A, et al. (2012): Evidence that the amyloid-beta protein precursor intracellular domain, AICD, derives from beta-secretase-generated C-terminal fragment. *J Alzheimers Dis.* 30:145-153.

39. Goodger ZV, Rajendran L, Trutzel A, Kohli BM, Nitsch RM, Konietzko U (2009): Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J Cell Sci.* 122:3703-3714.

40. Belyaev ND, Kellett KA, Beckett C, Makova NZ, Revett TJ, Nalivaeva NN, et al. (2010): The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a {beta}-Secretase-dependent Pathway. *J Biol Chem.* 285:41443-41454.

41. Lefranc-Jullien S, Sunyach C, Checler F (2006): APPepsilon, the epsilon-secretasederived N-terminal product of the beta-amyloid precursor protein, behaves as a type I protein and undergoes alpha-, beta-, and gamma-secretase cleavages. *J Neurochem*. 97:807-817.

42. Mei Y, Zhang Y, Yamamoto K, Xie W, Mak TW, You H (2009): FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:5153-5158.

43. Wang X, Wang Z, Chen Y, Huang X, Hu Y, Zhang R, et al. (2014): FoxO mediates APP-induced AICD-dependent cell death. *Cell Death Dis.* 5:e1233.

44. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, et al. (2000): Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*. 25:302-305.

45. da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A, et al. (2009): Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nature cell biology*. 11:1370-1375.

46. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. (2010): PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8:e1000298.

47. Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM (2014): Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci.* 37:315-324.

48. Morais VA, Haddad D, Craessaerts K, De Bock PJ, Swerts J, Vilain S, et al. (2014): PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. *Science*. 344:203-207.

49. Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, et al. (2010): PINK1dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:378-383.

50. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008): Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*.

51. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. (2007): FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 6:458-471.

52. Webb AE, Brunet A (2014): FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci.* 39:159-169.

53. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. (2016): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 12:1-222.

54. Zhu Y, Chen G, Chen L, Zhang W, Feng D, Liu L, et al. (2014): Monitoring mitophagy in mammalian cells. *Methods Enzymol.* 547:39-55.

55. Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW (2010): Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet*. 19:4861-4870.

56. Wang H, Song P, Du L, Tian W, Yue W, Liu M, et al. (2011): Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem.* 286:11649-11658.

57. Ghosal K, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW (2009): Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:18367-18372.

58. Ryan KA, Pimplikar SW (2005): Activation of GSK3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J Cell Biol.* 171:327-335.

59. Pardossi-Piquard R, Dunys J, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, et al. (2007): Response to correspondence: Pardossi-Piquard et al., "Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betAAPP and APLP." Neuron 46, 541-554. *Neuron*. 53:483-486.

60. Ross CA, Poirier MA (2004): Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* 10 Suppl:S10-17.

61. Takalo M, Salminen A, Soininen H, Hiltunen M, Haapasalo A (2013): Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *Am J Neurodegener Dis.* 2:1-14.

62. Jucker M, Walker LC (2013): Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 501:45-51.

63. Ciechanover A, Kwon YT (2015): Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & molecular medicine*. 47:e147.

64. Cai Y, Arikkath J, Yang L, Guo ML, Periyasamy P, Buch S (2016): Interplay of endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders. *Autophagy*. 12:225-244.

65. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, et al. (2005): Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 64:113-122.

66. Poole AC, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ (2008): The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA*.

67. Wilhelmus MM, Nijland PG, Drukarch B, de Vries HE, van Horssen J (2012): Involvement and interplay of Parkin, PINK1, and DJ1 in neurodegenerative and neuroinflammatory disorders. *Free Radic Biol Med.* 53:983-992.

68. Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ (2011): Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: The AICD enigma. *Cell Signal*.

69. Maloney B, Lahiri DK (2016): Epigenetics of dementia: understanding the disease as a transformation rather than a state. *Lancet Neurol*. 15:760-774.

70. Tatar M, Sedivy JM (2016): Mitochondria: Masters of Epigenetics. *Cell*. 165:1052-1054.

71. Robinson A, Grosgen S, Mett J, Zimmer VC, Haupenthal VJ, Hundsdorfer B, et al. (2014): Upregulation of PGC-1alpha expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP. *Aging Cell*. 13:263-272.

72. Choi J, Ravipati A, Nimmagadda V, Schubert M, Castellani RJ, Russell JW (2014): Potential roles of PINK1 for increased PGC-1alpha-mediated mitochondrial fatty acid oxidation and their associations with Alzheimer disease and diabetes. *Mitochondrion*, 18:41-48.

73. Cook DG, Leverenz JB, McMillan PJ, Kulstad JJ, Ericksen S, Roth RA, et al. (2003): Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E -e4 allele. *Am J Pathol.* 162:313-319.

74. Checler F (1995): Processing of the b-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 65:1431-1444.

Legends to Figures

Figure 1 PTEN-independent control of Pink-1 transcription by Presenilin 1.

(A,B) Pink-1 and actin protein levels in HEK293 cells stably overexpressing an empty vector

(Mock), presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2) cDNA in basal (-, white bars) or CCCP-

treated (+, black bars) conditions. Representative gels (A) of pooled data (B, n=6).

(**C**,**D**) Pink-1 promoter activity (**C**, n=18) and mRNA levels (**D**, n=9) in the above-described cell models were measured as described in the experimental procedures.

(**E-G**) Pink-1 mRNA levels (\mathbf{e} , $\mathbf{n}=8$) and promoter activity (\mathbf{f} , $\mathbf{n}=6$) in control (PTEN^{+/+}) or invalidated (PTEN^{-/-}) MEF cells. In **G**, Pink-1 promoter activity was measured in PTEN^{-/-} cells upon PS1 and PS2 overexpression ($\mathbf{n}=9$). Representative gels of PS1 and PS2 transfection efficiency and actin as gel charge control are provided in panel **G** (upper).

(**H,I**) Pink-1 promoter activity (**H**, n=12) and mRNA levels (**I**, n=6) in control MEF cells $(PS^{+/+})$ or cells invalidated for either PS1 $(PS1^{-/-})$ or PS2 $(PS2^{-/-})$ were measured as described in the experimental procedures.

(J-L) Pink-1 promoter activity (J, n=9) and mRNA levels (K, n=12) in control MEF cells ($PS^{+/+}$) or MEF cells devoid of both presenilin 1 and 2 ($PS^{-/-}$). In L, Pink-1 promoter activity was measured (n=7) in $PS^{-/-}$ cells transiently transfected with either PS1 or PS2 cDNA as described in experimental procedures. Representative gels of PS1 and PS2 transfection efficiency and actin as gel charge control are provided in L (upper panel).

In all histograms, data are expressed as percent of CT taken as 100 and represent means \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns= non-statistically significant).

Figure 2 Pink-1 control by presenilin 1 is γ secretase-dependent.

(A-C) Effect of the D257A presenilin 1 mutation on Pink-1 protein (A, n=12), promoter activity (B, n=9) and mRNA levels (C, n=12) after transient transfection of HEK293 cells with an empty vector (EV) or mutated cDNA (257). Representative gels of PS1 transfection efficiency and actin as gel charge control are provided in A-C (upper panels).

(**D**,**E**) Modulation of Pink-1 expression by γ -secretase inhibitors *ex-vivo* (**D**, n=12) and *in vivo* (**E**, n=6). In **D**, HEK293 cells were treated with DFK167 or DLN006 (D6) then analyzed for Pink-1 expression by Western blot analysis as described in experimental procedures section. Representative gels of Pink-1 and actin of pooled data are provided panel (**D**, left). In **E**, 4 month-old control (CT) and triple transgenic (3xTgAD) mice were daily treated for 10 days with a vehicle (CT, black bars) or with γ -secretase inhibitor (D6, white bars), then Pink-1 mRNA levels (n=8-9) were analyzed at 4 month-old as detailed in experimental procedures section. Data are expressed as percent of CT taken as 100 and represent means ± SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 3 γ -secretase-mediated control of Pink-1 is linked to β APP cleavage.

(A) Pink-1 and actin protein levels in HEK293 cells stably overexpressing an empty vector (Mock, black bars) or wild-type β APP (APP, white bars) in basal (-) and in CCCP-treated (+) conditions. Bars are means of n=12.

(**B**,**C**) Pink-1 promoter activity (**B**, n=12) and mRNA levels (**C**, n=12) in the above-described cell model were measured as indicated in the experimental procedures.

(**D**,**E**) Pink-1 promoter activity (**D**, n=12) and mRNA levels (**E**, n=9) in control (CT, black bars) or triple knockout (β APP^{-/-} and APLP2^{-/-} and lacking endogenous APLP1 referred to as tko, see results, white bars) MEF cells were measured as indicated in the experimental procedures.

(**F**) Pink-1 promoter activity was measured (n=6) in either CT or tko MEF cells transiently transfected with empty vector (EV) or PS1 cDNA.

(G,H) Pink-1 promoter activity (G) and mRNA levels (H) in CT and tko MEF cells were measured (n=6) in absence (CT) or presence of γ -secretase inhibitor (D6) as described in the experimental procedures.

Data are expressed as percent of CT taken as 100 and represent means ± SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 4 AICD controls Pink-1 transcription via FOXO3a.

(A-C) Analysis of the effect of AICD^{nls} (referred to as AICD) on Pink-1 protein (A, n=9), promoter activity (B, n=15) and mRNA levels (C, n=6) after transient transfection of HEK293 cells with empty vector (EV) or AICD^{nls} cDNA. Representative gels of Pink-1, AICD^{nls} and actin expressions are provided panel (A, left).

(**D**) Pink-1 promoter activity was measured (n=10) in the MEF cells upon EV or AICD^{nls} cDNA transient transfection. Representative gels of AICD cDNA transfection efficiency and actin as gel charge control are provided in left panel.

(E) Mapping of the functional interaction domain of AICD and Pink-1 promoter. Upper panel represents the 5' end deletion constructs of the full-length (FL) mouse Pink-1 promoter region. Pink-1 promoter constructs were co-transfected with the β -galactosidase reporter gene and either empty cDNA (EV, black bars, (-)) or AICD (white bars, (+)) cDNA then luciferase activity was measured (lower right, n=9) as described in experimental procedures. Lower left panel shows representative gels of AICD cDNA transfection efficiency and actin as gel charge control.

(**F**) AICD controls Pink-1 transcription via FOXO3a. Upper panel describes the two putative FOXO3a binding consensus motifs identified, by *in silico* approach, in the -2055- to -1353

region of the full length (FL) Pink-1 mouse promoter (referred to as F1 and F2). The effect of empty vector (EV, (-), black bars) or AICD^{nls} (white bars, (+)) on FL or deleted F1 (Δ F1) or F2 (Δ F2) Pink-1 promoters was analyzed as above in **F** (lower right panel, n=18). Lower left panel shows representative gels of AICD transfection efficiency and actin as gel charge control.

(G) Effect of LY294,002 on AICD-induced modulation of Pink-1 promoter activity. Pink-1 promoter constructs were co-transfected with the β -galactosidase reporter gene and either empty cDNA (EV) or AICD^{nls} (AICD) cDNA. Twenty-four hours after transfection, cells were treated for 15h with either vehicle ((-), black bars) or 10µM LY-294,002 (LY, (+), gray bars) then luciferase activity (n=12) was measured as described in Materials and Methods. Upper panel G shows representative gels of AICD transfection efficiency and actin as gel charge control.

Data are expressed as percent of controls (EV, EV(-) or FL condition) taken as 100 and represent means \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 5 Parkin controls Pink-1 transcription via presenilin 1 in a PTEN-independent manner. (**A**,**B**) Pink-1 promoter activity (**A**, n=9) and mRNA levels (**B**, n=12) measurements in HEK293 cells stably overexpressing either a control vector (Mock) or wild-type parkin (PK). (**C**,**D**) Pink-1 promoter activity (**C**, n=12) and mRNA levels (**D**, n=17) analyses in control ($PK^{+/+}$) or *parkin* gene knockout ($PK^{-/-}$) MEF cells.

(**E**,**F**) Pink-1 protein (**E**, n=6) and mRNA levels (**F**, n=6) analyses in control ($PK^{+/+}$) or *parkin* gene knockout ($PK^{-/-}$) mice brain.

(G,H) Pink-1 promoter activity analyses in $PS^{+/+}$ and $PS^{-/-}$ (E, n=18) or $PTEN^{+/+}$ and $PTEN^{-/-}$ (F, n=6) MEF cells transiently overexpressing either an empty vector (-, black bars) or wild-type PK (+, white bars).

Data are expressed as percent of controls taken as 100 and represent means \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 6 AICD controls mitochondrial homeostasis via Pink-1.

(A-C) Control (Pink-1^{ct}, black bars) or shRNA-depleted Pink-1 (Pink-1^{KD}, white bars) SH-SY5Y were treated with the γ -secretase inhibitor D6 and its effect on mitochondrial potential was measured by cell imaging (A,B, n=150 cells per experiment) and flow cytometry (C, n=12) as detailed in experimental procedures.

(**D-J**) Impact of control (EV) or AICD^{nls} overexpression on autophagy LC3-II (**E**, n=9) and p62 (**F**, n=9), mitochondrial mass TIM21 (**G**, n=9) and TOM20 (**H**, n=9) and mitochondrial dynamics-related proteins DRP1 (**I**, n=9) and MFN2 (**J**, n=9) markers was analyzed in Pink- 1^{ct} (black bars) or Pink-1 knockdown (Pink- 1^{KD} , white bars) SH-SY5Y cells (as described in the experimental procedures). Representative gels of markers, AICD transfection efficiency and actin (as gel charge control) are provided in indicated cells (**D**).

Data in histograms are expressed as percent of controls taken as 100 and represent means \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns= non-significant).

Figure 7 AICD controls Pink-1 transcription in vivo.

(A) Low (upper panel) and high (lower panel) magnification of immunohistochemical analyses of AAV-AICD^{nls} intranuclear localization in the *subiculum* of one month-old C57Bl6 mice injected at post-natal day 1 as described in the experimental procedure. Green and blue fluorescences correspond to AICD and DAPI nuclear labeling, respectively.

(**B**,**C**) Analysis (at 4 month-old) of the effect of AICD^{nls} overexpression after neonatal AAVmediated delivery on Pink-1 protein (**B**, n=4-9) and Pink-1 and neprilysin (NEP) mRNA (**C**, n=8-17, white bars) levels compared to age-matched administration of control virus (CT) or virus vehicle (PBS). Data in histograms are expressed as percent of controls taken as 100 and represent means \pm SEM (*p<0.05, **p<0.01).

(**D**,**E**) Pink-1 protein (**D**, n=3) and Pink-1 and neprilysin (NEP) mRNA levels (**E**, n=3) in aged-matched (13 months-old) control (Tg^{CT}) and AICD-Tg mice brain. Data in histograms are expressed as percent of controls taken as 100 and represent means ± SEM (*p<0.05).

(F) Model of the molecular interplay linking PK and Pink-1. PK up-regulates PS1/ γ -secretase activity, thereby promoting FOXO3a-dependent AICD-mediated control of Pink-1 transcriptional regulation. Since Pink-1 recruits PK to modulate mitochondrial dynamics and mitophagy, the functional interplay between PK and Pink-1 supports their cellular homeostasis and thereby, controls mitochondria physiology and governs their responsiveness and adaptation to pathological conditions.



Figure 1 Goiran et al.









Figure 4 Goiran et al.



Figure 5 Goiran et al.



Figure 6 Goiran et al.





βAPP Intracellular Domain Controls Mitochondrial Function by Modulating PINK1 Transcription in Cells and in Alzheimer Mice Models

Supplemental Information

Supplementary Methods and Materials

Cellular and animal models

Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), Human Embryonic Kidney (HEK293), SH-SY5Y human neuroblastoma, cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin ($50\mu g/ml$) and incubated at 37° C in a 5% CO₂ atmosphere.

Characterization of HEK cells stably overexpressing wild-type PS1, PS2 and wild-type and mutated β APP have been described in (1, 2). Immortalized MEFs invalidated for the genes of *Parkin* and *Pten* have been respectively provided by Drs. T. Dawson and V. Stambolic and were characterized in (3, 4). MEF cells invalidated for the genes of *Pink-1*, *Presenilin 1*, *Presenilin 2* and both *Presenilins* were provided by Dr. B. De Strooper and characterized in (5-7). Wild-type MEF cells (naturally devoid of the β APP isoform *APLP1*) or doubly invalidated for β APP and *APLP2* isoform were provided by Dr. U. Muller and characterized in (8). SH-SY5Y cells shRNA depleted for Pink-1 have been provided by Dr. A-Y Abramov and described in (9). HEK293 cells stably overexpressing wild-type PK were described in (3). The 3xTgAD (harboring PS1_{M146V}, APP_{swe} and Tau_{P301L} transgenes) provided by Dr. LaFerla and 2xTgAD (PS1_{WT}, APP_{swe}, and Tau_{P301L}) mice models have been extensively described in (10). AICD/Fe65 transgenic mice (AICD-Tg) were described in (11, 12). The Parkin knockout mice model provided by Dr. O. Corti has been described in (13).

Cellular and mouse brain sample preparation and Western blot analysis

Cells were lysed in Prusiner's buffer (Tris-HCl 1M; pH 7.5 containing NaCl (150mM), EDTA (5mM), Triton X100 (0.5%), deoxycholate and protease inhibitor cocktail) and then briefly sonicated. Mouse brains were lysed in RIPA buffer (Tris 50mM; pH 7.4 containing NaCl (150mM), EDTA (1mM), Triton X100 (1%), deoxycholate (0.5%), SDS (0.1%) and protease inhibitor cocktail) and submitted to a Dounce homogenization followed by a brief sonication. Samples were then ultracentrifuged and supernatants were used for Western-blot analysis. After protein concentration dosage by Bradford assay (14), aliquots of 50µg of total protein were loaded to (8-16%) SDS-PAGE gels. After migration, proteins were wet-transferred to Hybond C (GE Healthcare, France) membranes and immunoblotted using a panel of antibodies described below. Immunological complexes were revealed with either anti-rabbit or anti-mouse IgG-coupled peroxidase antibodies (Jackson ImmunoResearch Europe, UK) by the electrochemiluminescence detection method (Roche Diagnostics, Switzerland). Chemiluminescence was recorded using a luminescence image analyzer LAS-4000 (FUJIFILM, USA) and quantifications of images were performed with the FUJIFILM Multi Gauge image analyzer software. The antibodies used in the Western blot analysis are the following: anti-Pink-1 C-terminal (BC100-494, Novus Biologicals, USA and AC-R3173-2 Abiocode, USA), anti-PS1 N-terminal and PS2 loop (provided by Dr. G. Thinakaran), anti-APP C-terminal (gift from P. Fraser), anti-APP 6E10 (Biolegend, USA), anti-DRP1 (anti-DRP1 MAb, 611112, BD Transduction Laboratories, USA), anti-MFN2 (ARP 42420_P050, Aviva System Biology (USA) or Mouse MAb to MFN2 Ab56889-100, Abcam, United Kingdom), anti-LC3 (NB100-2220, Novus Biologicals, USA), anti-p62/SQSTM1 (NBP1-49956 Novus Biologicals, USA), anti-PTEN (A2B1, sc-7974, Santa Cruz Biotechnology, Germany), anti-PK (MAB5512, Millipore-Sigma, USA), anti-TIM23 (611222) and antiTOM20 (612278, BD Biosciences, USA) and anti-actin (clone AC-74, A5316, Millipore-Sigma, USA) antibodies.

In vitro γ -secretase activity and western blot analysis

Membrane fractions of dissected hippocampi of wild-type and 3xTgAD mice were prepared as described previously (10). For γ -secretase assay, membrane fractions were solubilized in CHAPSO (0.25%) and incubated over-night at 37°C or 4°C with recombinant substrate preparations (C100-flag, 1% v/v) in absence or in the presence of the γ -secretase inhibitor difluoroketone-167 (DFK167, 50 μ M) (15). A β and AICD-flag were detected by Western blotting using, anti-A β WO2 (Millipore) and anti-flag (Sigma) antibodies. Membrane fractions were also analyzed for C99, C83 and AICD expression by Western blot analysis using the APP-Cter antibody (kindly provided by P. Fraser).

Immunohistochemistry

Animals were deeply anaesthetized with pentobarbital and perfused transcardially with cold PBS followed by 4% paraformaldehyde/PBS. Brains were removed from the skull and placed in the same fixative another 24 hours. Hereafter, vibratome slides (80μ m) of the brains were treated with 90% formic acid during 4 minutes and blocked with 5% BSA/0.05% Tween-20 during 1 hour. Sections were then incubated at 4°C overnight with the primary antibody (α -APP-Ct, diluted 1/1000 in 2.5% BSA/0.05% Tween-20). After washes, sections were incubated with fluorescent AlexaFluor antibodies (Alexa 488-conjugated, Molecular Probes (1:1000) and DAPI (1:10000)) at room temperature during 1 hour. Immunofluorescence was visualized using a confocal microscope (Fluoview10, Olympus).

Constructs description

Mouse Pink-1 promoter constructs deleted of the FOXO3a potential binding sites were obtained by directed mutagenesis. Briefly, the mouse wild-type and full length Pink-1 promoter was used as a template in a high-fidelity polymerase chain reaction containing the couple of primers encompassing the deletion of FOXO3a binding site -1675/-1655 (forward: 5'-CCAAAGAACCTTTCTCAGGTCCACTTCCTT-3' reverse: 5'-AAGGAAGTGGAACCTG AGAAAGGTTCTTTGG-3') or the couple of primers encompassing the deletion of Foxo3a binding site -1467/-1448 (forward: 5'-AGCGCGCTCTATTGACATCTTTAGGCAGC-3' and reverse: 5'-GCTGC CTAAAG ATGTCAATAGAGCGCGCT-3').

The cDNA of human PK cloned in the pIRES2-EGFP-NEO vector (Takara Bio, USA) has been previously described (3). Full length and 5'end-truncated Pink-1 human and mouse promoter-luciferase constructs have been previously described (6). Human PTEN promoter-luciferase constructs have been previously described (7).

The AICD^{nls} sequence cloned between the EcoRI and XhoI sites in the pcDNA4 Myc-His version C (Invitrogen/Thermo Fischer USA) was obtained by PCR using human APP cDNA as a template, the forward primer 5'-GGAATTCCACCATGCCAAAAAAGAAGAG AAAGGTAGTGATGCTGAAGAAGAAGAACAGTAC-3' containing a EcoRI site (underlined) sequence followed by a nls (in bold) and the reverse primer: 5'-CCGCTCGAGCGTTCTGCATCTGCTCAAAG-3' containing XhoI site a (Invitrogen/Thermo Fischer USA). The AICD^{nls} sequence was then PCR amplified with the forward primer: 5'-CGGCTAGCCACCATGCCAAAAAAGAAGAAGAGAAAGGTAGTG-3' and the reverse primer: 5'-CGGCTAGCTCAGTTCTGCATCTGCTCAAAGAACTTGTAG-3' containing a NheI restriction site (underlined) and a stop codon (in bold). The DNA fragment obtained was subcloned after NheI digestion in the scAAV-Syn-I-WPRE vector (a gift from Martine Barkats). All the constructs obtained were validated by sequencing.

4

mRNA analysis

The following primers were used to analyze the relative mRNA levels of human *Pink-1* (forward 5'-CGA-GGA-ACT-CGT-TTG-AAG-GG-3'; reverse 5'-CCA-GGT-GGC-AAA-TCA-GAC-ATG-3'), mouse *Pink-1* (forward 5'-CGC-CTA-TGA-AAT-CTT-TGG-GC-3'; reverse 5'-GCA-CTG-CCT-TGG-CCA-TAG-AA-3'), human *PTEN* (forward 5'-GCT-ACC-TGT-TAA-AGA-ATC-ATC-TGG-A-3'; reverse 5'- CTG-GCA-GAC-CAC-AAA-CTG-AG-3'), mouse *PTEN* (forward 5'- AGG-CCA-ACC-GAT-ACT-TCT-CTC-3'; reverse 5'-CAT-CTG-GAG-TCA-CAG-AAG-TTG-AA-3'), mouse *NEP* (forward 5'-ACT-TTT-CCT-GGG-ACC-TAG-CAG-AAG-TTG-AA-3'), mouse *NEP* (forward 5'-ACT-TTT-CCT-GGG-ACC-TAG-CAG-3'; reverse 5'-CCA-TTA-TCA-GCA-ATG-TTT-TCT-CC-3') genes were normalized for RNA concentrations with human *Topoisomerase 1* (forward 5'-CCC-TGT-ACT-TCA-TCG-ACA-AGG-3'; reverse 5'- CCA-CAG-TGT-CCG-CTG-TTT-C-3'), mouse *Topoisomerase 1* (forward 5'-TGC-CTC-CAT-CAC-ACT-ACA-GC-3'; reverse 5'-CGC-TGG-TAC-ATT-CTC-ATC-AGG-3') and human *GAPDH* (forward 5'-AGC-CAC-ATC-GCT-CAG-ACA-C-3'; reverse 5'-GCC-CAA-TAC-GAC-CAA-ATC-C-3') and mouse *GAPDH* (forward 5'-TGT-CCG-TCG-TGG-ATC-TGA-C-3'; reverse 5'-CGT-GCT-CCA-CTG-TCA-CAC-ATC-GAC-CAA-ATC-C-3') housekeeping genes.

Total RNA from cells and mice brains were extracted using the RNeasy mini kit and RNeasy universal, respectively following the instructions of manufacturer (Qiagen, Germany). Total RNA (2µg) was reverse-transcribed with GoScript[™] Reverse Transcriptase (Promega, USA) using oligo-dT priming. Real-time PCR were performed in the Rotor-Gene6000 (Qiagen, Germany), using the SYBR Green detection protocol recommended by the manufacturer. Specific-gene primers were designed by means of the Universal Probe Library Assay Design Center software (Roche Applied Science, Switzerland).

Promoter activities assay

Promoter-luciferase activities were measured after co-transfection of 1µg of the above cDNAs and 1µg of β -galactosidase cDNA in order to normalize transfection efficiencies. In a subset of experiments, promoter-luciferase activities were measured after co-transfection of 1µg of the above cDNAs, 1µg of AICD^{nls} cDNA (pcDNA4Myc-His) and 0,5µg of β -galactosidase cDNA in order to normalize transfection efficiencies.

AAV-NLS-AICD production and mice injection

Virus production was performed following a previously established procedure. Briefly, HEK293 cells were transfected with the adenovirus helper plasmid (pXX6), the AAV packaging plasmid (rAAV2-rh10), and the above-described AAV10 plasmid encoding the human AICD^{nls} under the control of the synapsin-1 promoter described in constructs section. The recombinant vectors were purified by ultracentrifugation on an iodixanol density gradient and the viral preparation was then desalted and concentrated with Amicon Ultra-Ultra cell 100K filter units (Millipore-Sigma, USA). Aliquots were stored at -80°C until use. Vector titers were determined by real-time PCR and expressed as viral genomes per ml (vg/ml) (16). For *in vivo* delivery, newborn (1 day old) C57BL6 mice were injected with 4µl of AAV virus (5x10¹² vg/ml) into the left lateral ventricle. The injection site was located 1 mm lateral from the sagittal suture, halfway between lambda and bregma and injections were performed with a 32-gauge needle and gas tight syringe (Hamilton). Mice were sacrificed and analyzed at 1, 2 or 3 months post-AAV delivery. The injected left hemispheres were submerged in RNA*later* RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Germany) 2 days then total RNA were extracted for qPCR analysis. The right hemispheres were used for Western-blot analysis.

Mitochondrial potential disruption analysis

Mitochondrial potential ($\Delta \psi$ mit) was accessed using live imaging analysis of TMRM (tetramethyl-rhodamine-methyl-ester) probe as detailed. Cells spotted on 25 mm coverslips were loaded with 10 nM tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) in cell culture medium at 37°C for 30 min. Images were acquired (excitation: 559 nm, emission: 575–675 nm) on a LEICA TCS SP5 confocal microscope (Leica Microsystems) at 37°C. To obtain normalized TMRM fluorescence signal, Z-stack images mages were acquired before and after application of 5 μ M mitochondrial uncoupler FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone). To demonstrate specific TMRM binding, measurements were corrected for residual TMRM fluorescence after full $\Delta \psi$ mit collapse with FCCP (17). TMRM intensity was quantified on Z-stack maximal projection images after thresholding, using ImageJ software (18).

The TMRM signal was also analyzed using the NovocyteTM flow cytometer (ACEA Biosciences Inc.) at the excitation wavelength of 585 nm. For each experiment, TMRM fluorescence from 10,000 cells was acquired and the mean value was obtained using the NovoExpressTM software (ACEA Biosciences Inc.). Cellular gating was set the same way in all measurements. Cells treated with FCCP were used as controls.

Statistical analysis

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

Supplementary Figures



Fig. S1. Endogenous and overexpressed Presenilins control PTEN transcription.

(A-C) Analysis of PTEN protein (A, n=12), human promoter activity (B, n=18) and mRNA levels (C, n=12) in HEK293 cells stably transfected with an empty vector (Mock), presenilin 1 (PS1) or presenilin 2 (PS2) cDNA in basal conditions. A representative gel of data is provided in A (upper panel). (D and E) PTEN mouse promoter activity (D, n=6) and mRNA levels (E, n=6) levels were analyzed in control ($PS^{+/+}$) and PS1 ($PS1^{-/-}$) or PS2 ($PS2^{-/-}$) MEF cells invalidated as described in the experimental procedures. Data are expressed as percent of controls (Mock, in A-C and $PS^{+/+}$ in D and E) taken as 100 and represent means ± SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns=non significant).



Fig. S2. Pink-1 mRNA levels analysis in 2xTgAD and 3xTgAD mice.

Analysis of Pink-1 mRNA levels in brain hippocampus of either 3xTgAD (A, n=6, at the indicated ages) or 12 month-old 2xTgAD mice (B, n=6). Data (A,B) are expressed as percent of age-matched control (CT) wild-type mice taken as 100 and represent means \pm SEM (*p<0.05 and **p<0.01).

CER AN



Fig. S3. ELND006 (D6) treatment of 3xTgAD mice fully blocks γ -secretase activity and drastically lowers AICD, *in vivo*.

Wild-type (WT) and 3xTgAD (AD) mice were treated daily during 10 days via oral gavage, with the γ -secretase inhibitor ELND006 (30mg/kg, Elan Pharmaceuticals, South San Francisco) or with vehicle alone (methylcellulose/polysorbate 80, Sigma). After treatment, mice were sacrificed and hippocampi were dissected for membrane fraction preparation. (A) γ -secretase activity was measured using recombinant C100-flag in a cell free assay as described (15). A β - and AICD-production were monitored using a mix of two antibodies (WO2 and anti-flag antibodies for A β - and AICD-detection respectively). (B) Levels of C99, C83 and AICD were analyzed in membrane fraction of D6-treated wild-type and 3xTgAD mice by western blotting using APP-Cter antibody. Synthetic AICD (5ng) was used as standard and actin as loading control. Signals were revealed after short- and long-term gel exposures as indicated.
ACCEPTED MANUSCRIPT



Fig. S4. Influence of APPwt and APPɛ on Pink-1.

(A) Representative gel of APP expression in stably transfected HEK293 cells expressing either wild-type (APPwt)- or Swedish mutated (APPsw)- β APP and actin gel load control. (**B**,**C**) Pink-1 mouse promoter activity (**B**, n=9) and mRNA levels (**C**, n=12) levels in Mock-transfected (Mock), APPwt and APPsw were measured as indicated in the experimental procedures. (**D**) Pink-1 mouse promoter activity (n=9) in transiently transfected empty vector (EV), APPwt and APP ϵ were measured as indicated in the experimental procedures. Data are expressed as percent of control (mock-transfected cells) taken as 100 and represent means ± SEM (*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001 and ns=son-significant).

ACCEPTED MANUSCRIPT



Fig. S5. γ -secretase inhibitors reduce mitochondrial potential in Pink^{+/+} but not in Pink^{-/-} MEF cells.

(**A**,**B**) Pink-1^{+/+} (black bars) or Pink-1^{-/-} (white bars) mouse fibroblasts were treated with either drug vehicle (CT) or with the γ -secretase inhibitors ELN006 (D6) or DFK167 (DFK) and their effect on mitochondrial potential disruption was measured by cell imaging with TMRM as described in the experimental procedures section. Data in **B**, are expressed as percent of control Pink^{+/+} cells taken as 100 and represent means (n=150 cells per experiment performed) ± SEM (***p<0.001 and ns=non significant).

12

ACCEPTED MANUSCRIPT





(A-C) Analysis of Pink-1 protein (A,B) and mRNA levels (C) in control (Pink-1^{Ct}) or shRNA depleted Pink-1 (Pink-1^{KD}) SH-SY5Y cells in basal (C, n=6) and CCCP treated conditions (B, n=12). (D-H) Analysis of the impact of Pink-1 knockdown on LC3-II (D and E, n=9), p62 (D and F, n=9), TIM23 (D and G, n=15) and TOM20 (D and H, n=15) expressions in control (Pink-1^{Ct}) or shRNA depleted Pink-1 (Pink-1^{KD}) SH-SY5Y cells in absence (black columns, (-)) or presence of CCCP (white columns, (+)) treatment as described in the experimental procedures section. (I-K) Analysis of the impact of a Pink-1 knockdown in basal conditions on DRP1, (I,J, n=9) and MFN2, (I,K, n=9) expressions in Pink-1^{Ct} or Pink-1^{KD} cells. Gel charge control (actin) is provided in (A,D and I).Data are expressed as percent of Pink-1^{ct} controls taken as 100 and represent means ± SEM (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ns=non significant).

Supplementary References

- 1. Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, et al. (1999): Unusual phenotypic alteration of b amyloid precursor protein (bAPP) maturation by a new Val->Met bAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:4119-4124.
- 2. Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, Boyer N, et al. (2006): Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 26:6377-6385.
- 3. Duplan E, Sevalle J, Viotti J, Goiran T, Bauer C, Renbaum P, et al. (2013): Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription. *J Mol Cell Biol.* 5:132-142.
- 4. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, et al. (2001): Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*. 8:317-325.
- 5. De Strooper B, Simons M, Multhaup G, Van Leuven F, Beyreuther K, Dotti CG (1995): Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence. *The EMBO J.* 14:4932-4938.
- 6. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B (2000): Total inactivation of g-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2:461-462.
- 7. Morais VA, Haddad D, Craessaerts K, De Bock PJ, Swerts J, Vilain S, et al. (2014): PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. *Science*. 344:203-207.
- 8. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner JA, Aguzzi A, Rülicke T, et al. (2000): Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci*. 20:7951-7963.
- 9. Wood-Kaczmar A, Gandhi S, Yao Z, Abramov AY, Miljan EA, Keen G, et al. (2008): PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One*. 3:e2455.
- 10. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, et al. (2012): The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci.* 32:16243-16255a.
- 11. Ghosal K, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW (2009): Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:18367-18372.
- 12. Ryan KA, Pimplikar SW (2005): Activation of GSK3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. *J Cell Biol*. 171:327-335.
- 13. Itier J-M, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, et al. (2003): Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Gen.* 12:2277-2291.

- 14. Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-259.
- 15. Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournie-Zaluski MC, Roques B, Checler F (2009): Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. J Neurochem. 109:248-256.
- 16. Mei Y, Zhang Y, Yamamoto K, Xie W, Mak TW, You H (2009): FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:5153-5158.
- 17. Duchen MR, Surin A, Jacobson J (2003): Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol.* 361:353-389.
- 18. Chami M, Prandini A, Campanella M, Pinton P, Szabadkai G, Reed JC, et al. (2004): Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca2+ signaling, which do not depend on their putative pore-forming region. *J Biol Chem.* 279:54581-54589.

ARTICLE 2:

p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional regulation

Thomas Goiran, Eric Duplan, Lila Rouland, Wejdane Elmanaa, Inger Lauritzen, Julie Dunys, Han you, Frédéric Checler and Cristine Alves Da Costa.

I. Introduction

p53 est un facteur de transcription qui régule positivement ou négativement un grand nombre de gènes (Riley et al., 2008) jouant un rôle important dans le contrôle de la destinée cellulaire ainsi que les mécanismes liés à l'apoptose et à l'autophagie. Le contrôle de l'autophagie par p53 dépend de sa localisation subcellulaire (Maiuri et al., 2010). p53 « nucléaire » est un effecteur pro-autophagique via son activité transcriptionnelle dans les conditions de stress (Maiuri et al., 2010; Sui et al., 2011). p53 « cytoplasmique » est associée à la répression de l'autophagie en condition basale (Tasdemir et al., 2008a, 2008b). p53 est un activateur transcriptionnel de la parkine, une protéine dont la fonction est controllée par PINK1. Ceci nous a conduits à examiner la capacité potentielle de p53 à contrôler les niveaux et la fonction de PINK1.

II. Résultats

Nous décrivons ici, le premier gène pro-autophagique, réprimé transcriptionnellement par p53 dans des conditions basales et de stress. Nous démontrons par des approches multiples et complémentaires que p53 réprime la transcription du gène codant PINK1. Ainsi, la réduction pharmacologique et génétique de l'activité transcriptionnelle de p53 réduit la transcription de PINK1 ex-vivo et in-vivo. Cette régulation se fait par l'interaction de p53 sur le promoteur de PINK1 et dépend de la localisation subcellulaire de p53 dans le noyau. Nous montrons que la réduction de la mitophagie par p53 est partiellement antagonisée par la déplétion de PINK1. Notre étude démontre pour la première fois, un rôle transcriptionnel anti-autophagique de p53 dans des conditions basales ou de stress.

Phomas Goiran, Eric Duplan, Lila Rouland, Wejdane Elmanaa, Inger Lauritzen, Julie Dunys, Han you, Frédéric Checler and Cristine Alves Da Costa.

p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional regulation

Thomas Goiran¹, Eric Duplan¹, Lila Rouland¹, Wejdane el Manaa¹, Inger Lauritzen¹, Julie Dunys¹, Han You², Frédéric Checler¹ and Cristine Alves da Costa¹

1- Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, team labeled "Laboratory of Excellence (LABEX) Distalz", 660 route des Lucioles, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

2- State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, Innovation Center for Cell Signaling network, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China.

* Correspondence should be addressed to Cristine Alves da Costa, Tel: 33 4 93953457, Fax:
33 4 93953408; email: <u>acosta@ipmc.cnrs.fr</u> and Frédéric Checler, Tel: 33 4 93953460, Fax:
33 4 93953408; email: <u>checler@ipmc.cnrs.fr</u>.

Running title: p53 blocks mitophagy via its transcriptional function.

Keywords: p53, autophagy, PINK1, transcription, in vivo

Abstract

p53 is a transcription factor that is strongly implicated in the control of both apoptotic and autophagic cell death. It has been shown that p53 can elicit both pro-autophagic and antiautophagic phenotypes depending of its intracellular localization. The ability of p53 to repress autophagy has been associated to its cytoplasmic localization. We show here that p53dependent repression of autophagy is also linked to its transcriptional activity. Thus, p53 represses promoter activity of PINK1, a key protein for the control mitophagy. We show that nuclear p53 down-regulates PINK1 protein and mRNA levels ex-vivo and in vivo. This regulation is linked to the interaction of p53 with PINK1 promoter since the deletion of an identified p53 responsive element on PINK1 promoter impacts p53-mediated PINK1 transcriptional repression. Furthermore, we demonstrate that nuclear p53 only is able to control PINK1 transcription. Finally, combining pharmacological and genetic approaches, we show that the negative regulation of autophagy by p53 is PINK1-dependent since pifithrinalpha-mediated blockade of p53 transcriptional activity triggers enhanced autophagic response that is fully abolished by PINK1 depletion. This data unravels a novel p53-linked control of autophagy/mitophagy that implies its transcriptional activity that could convey important dysfunctions in both neurodegenerative and cancer diseases.

Introduction

p53 is a key multifunction protein, the implication of which implication has been extensively investigated in various pathologies. It is a transcription factor that may positively or negatively regulate a huge number of genes¹ involved in cell-fate control mechanisms linked to both apoptosis and autophagy. There is a consensus concerning the fact that p53-dependent control autophagy is directly linked to its subcellular localization². Thus, in stress conditions, p53 acts as a pro-autophagic mediator ^{2, 3} by modulating genes implicated in the regulation of mTOR (mammalian target of rapamycine), a negative modulator of autophagy⁴. p53 also controls the transcription of Death-associated Protein Kinase-1 (DAPK-1)⁵ and Damage-Regulated Autophagy Modulator (DRAM)⁶, two key players of autophagic response. Conversely to this pro-autophagic phenotype that involved transcriptional function of p53, cytoplasmic p53 can repress autophagy in absence of any cellular stress^{7, 8}. This inhibitory effect is independent of its transcriptional function and molecularly linked to the activation of the AMPK-dependent inhibition of mTOR signaling cascade⁷.

Interestingly, several works have shown a functional interplay between p53 and parkin. Thus, in physiological conditions, parkin and p53 repress the transcription of each other via their DNA binding properties ^{9, 10, 11}. Parkin is also involved in the degradation of several toxic proteins by the proteasome via its ubiquitin-ligase activity¹² and was shown to be recruited to mitochondria and activated by PINK1 (PTEN-induced Kinase 1) upon its phosphorylation ^{13, 14}. In pathological conditions, the turnover of PINK1 is inhibited, leading to its stabilization in mitochondria outer membrane and parkin recruitment and phosphorylation. Consequently, activated parkin mediates the specific elimination of defective mitochondria by the lysosomal system^{15, 16}. These data linking p53 and parkin led us to hypothesize that p53 and PINK1 could be linked molecularly to control mitophagy.

We describe here the first pro-autophagic gene transcriptionally controlled by p53 in both basal and stress conditions. We demonstrate that p53 represses the transcription of the pro-mitophagy

gene PINK1 by several approaches. Thus, pharmacological and genetic modulation of p53 leads to a downregulation of PINK-1 transcription ex-vivo and in vivo. This regulation is mediated by p53 interaction with PINK1 promoter and dependent of its nuclear subcellular localization. Finally, we show that p53 repression of autophagy is PINK1-dependent.

Thus, our study delineates for the first time an anti-autophagic phenotype implying p53 transcriptional activity in basal and stress conditions. This novel observation may major impact in multiple diseases including neurodegenerative disorders and cancer where p53 function is altered and where autophagic dysfunction has been consistently documented.

RESULTS

Pharmacological modulation of p53 impacts PINK1 transcription.

We have modulated the p53 transcriptional activity by treating SH-SY5Y neuroblastoma human cells with etoposide (ETO), a topoisomerase II genotoxic agent that stabilizes p53 by favoring its phosphorylation ¹⁷. As expected, we observed an ETO-associated increase in p53 (Fig.1**a**) that was associated with a reduction of PINK1 protein expression (Fig.1**a**), promoter transactivation (Fig.1**b**) and mRNA levels (Fig.1**c**), suggesting a p53-dependent inhibitory control of PINK1 transcription. We confirmed this hypothesis by assessing the effect of pifithrin- α , a chemical inhibitor of p53 that specifically blocks its transcriptional activity ¹⁸. Thus, PFT-induced blockade of p53 increases both PINK1 protein expression (Fig.1**d**) and mRNA levels (Fig.1**e**). Overall, this set of data suggests p53 as a transcriptional inhibitor of PINK1 transcription.

Endogenous and overexpressed p53 repress PINK1 transcription.

We aimed at examining the influence of overexpressed and endogenous p53 on PINK1 transcription. Transient overexpression of human wild-type p53 cDNA in SH-SY5Y cells leads to a drastic reductions of PINK1 protein, promoter activity and mRNA levels (compare control empty vector, (EV, white bars) and p53 (black bars) in Fig.2**a-c**). The assessment of PINK1 modulation by endogenous p53 in the human colorectal carcinoma cell line HCT116, where PINK1 gene was genetically invalidated, faced general observation that PINK1 expression is generally low in fibroblasts and, more generally, in non-neuronal cells. Thus, in this set of experiments, we took advantage of previous data, which consistently documented a stabilization of PINK1 by the stress-associated inducer of mitochondrial-depolarization -[2-(3-Chlorophenyl)hydrazinylyidene] propanedinitrile (CCCP) ¹⁹. p53 depletion (p53^{-/-}, black bars) increases PINK1 protein expression, promoter transactivation and mRNAlevels (Fig.2**d**-

f). In rescue experiments, we show that human p53 cDNA transfection in HCT116 p53^{-/-} cells restores inhibitory phenotype on PINK1 promoter activity (Fig.2**g**) and mRNA levels (Fig.2**h**). Similar phenotype was observed in an additional model of TP53 invalidation (Immortalized mouse embryonic fibroblasts invalidated for either p19^{arf} (A-, empty bars) or for both TP53 and p19^{arf} genes (AP- black bars)), which display increased levels of PINK1 promoter activity (Figure S1**a**) and mRNA levels (Figure S1**b**). Altogether, combined genetic and pharmacological data demonstrate the role of endogenous p53 as a transcriptional repressor of PINK1.

p53 controls PINK1 transcription by direct binding.

In order to ascertain if PINK1 is a direct p53 target, we have analyzed the effect of p53 expression (see Fig.3a, middle) on full-length and 5'-deleted constructs of PINK1 mouse promoter in frame with luciferase (Fig.3a, upper). p53 represses PINK1 transcription whatever the promoter construct used, indicating that at least one putative functional p53 consensus motif was located in the shorter 0.4Kb construct (Fig.3a, lower). In silico examination of this sequence led to the identification of two putative (-296/-285 and -167/-154) p53 responsive elements (Fig.3b, upper). Since the -167/-154 (CCAGctgcacCAAG) sequence fits better with the admitted p53 responsive element (CxxG-N6-CxxG, Fig.3b upper), we have deleted the -167/-164 CCAG motif from the 0.4Kb sequence (construct referred to as 0.4Δ) and examined the impact of this deletion on p53-dependent PINK1 promoter transactivation. This deletion partially abolishes PINK1 promoter activity (compare black bars in Fig.3b, lower). This data validates the -167/-154 sequence as a functional p53 responsive element and confirms the ability of p53 to directly repress PINK1 transcription. Deletion of the four nucleotides in 0.4 did not fully abolish p53-associated inhibitory effect (Fig.3b, lower). This could indicate a potential participation of the less conserved responsive element located at -296/-285. It remains that the above set of data demonstrates a direct interaction of p53 with PINK1 promoter responsible for the p53-dependent repressor phenotype.

p53-associated control PINK1 requires p53 nuclear localization.

As stated in the introduction, sub-cellular localization of p53 conditions its pro- or antiautophagic function. We have investigated the impact of the pharmacological and genetic modulation of p53 cellular localization on PINK1 transcription. Leptomycin, a drug that blocks the export of most proteins from the nucleus^{20, 21} triggers a drastic reduction of PINK1 protein expression (Fig.4a), promoter activity (Fig.4b) and mRNA levels (Fig.4c), suggesting that p53-dependent control of PINK1 transcription requires nuclear p53. Several works have shown that nuclear p53 exerts a pro-autophagic role while cytoplasmic p53 triggers an antiautophagic phenotype. Thus, we were facing a case where PINK1 could well behave as the first pro-autophagic gene transcriptionnally repressed by p53. To strengthen this hypothesis, we designed constructs encoding either wild-type p53 coupled to GPF (WT) or p53 mutated in its nuclear export (GFP-p53 L22Q, W23S, NES^m) or nuclear import (GFP-p53 KKK280-282AAA, NLS^m) domains previously delineated^{22, 23} and we examined impacts of their expression on PINK1 transcriptional regulation in SH-SY5Y cells. Histochemical analysis of GFP-tagged p53 constructs revealed that the NES and NLS mutations indeed blocked p53 in the nucleus and cytoplasm, respectively. Of most interest, only nuclear p53 decreases PINK1 promoter activation (Fig.4e, NES^m, black bars) and mRNA levels (Fig.4f, NES, gray bars) while blockade of p53 in the cytoplasmic compartment (NLSm, dark gray bars in 4e,f) fully abolished p53-associated control of PINK1. These data firmly demonstrate that PINK-1 transcriptional regulation absolutely requires nuclear p53 and thus, unravels PINK1 as the first pro-autophagic gene repressed by p53. This is the very first demonstration of an antiautophagic phenotype linked to p53 transcription factor function.

p53 negative control of autophagy is dependent of PINK1 trans-repression.

In order to functionally link p53 and PINK1 and to assess the contribution of PINK1 in p53related autophagic phenotype, we treated human haploid (HAP) cells harboring (PINK^{+/+}) or lacking (PINK^{-/-}) endogenous PINK1 with PFT. Corroborating previous data ^{7, 8}, the blockade of endogenous p53 by PFT triggers an increase of autophagy. Thus, PFT-treated PINK1^{+/+} cells display increased expressions of LC3-2 (Fig.5a,b) and p62 (Fig. 5a,c). Very interestingly, PFT-mediated effect on these autophagic markers was abolished by PINK1 deletion (Fig.5a-c). In agreement with our above-described hypothesis, this data indicate that PFT likely enhances autophagic PINK1, a phenotype abolished by PINK1 depletion.

p53 controls PINK1 transcription and protein expression in vivo.

Is PINK1 down-regulated by p53, in vivo? We have analyzed the impact of both adenoviraloverexpression (Fig.6**a**,**b**) or invalidation (Fig.6**c**,**d**) of p53 on PINK1 protein and mRNA levels. Striatal overexpression of p53 triggers a decrease of PINK1 protein (Fig.6**a**) and mRNA (Fig.6**b**) levels. Conversely, depletion of endogenous p53 in mouse brain yields an increase of PINK1 protein (Fig.6**c**) and mRNA (Fig.6**d**) levels. It should be noted that p53 invalidation impacts neuronal PINK1 transcription and protein expression, in vivo, in absence of any stress. This data confirms the fact that endogenous level of PINK1 protein remains under detectable threshold in non-neuronal cellular models and requires CCCP treatment (Fig.2**a**) unlike is the case in a neuronal context.

DISCUSSION

Several works underlined a duality in the ability of p53 to control autophagic response. Thus, both p53 activation and depletion trigger increased autophagy. It is consensually admitted that genotoxic stress or oncogenic activation triggers a p53-dependent pro-autophagic phenotype that is mostly due to nuclear p53 transcriptional activity. Conversely, p53-linked antiautophagic response is independent of its ability to regulate gene transcription but rather linked to cytoplasmic p53. Thus, it was shown that several autophagy inducers enhanced the proteasomal degradation of p53 and thereby, down-regulate autophagic response⁷. Furthermore, the work of Tasdemir et al. has demonstrated that endogenous p53 could repress autophagy via the inhibition of AMPK and activation of mTOR. This conclusion was supported by the observation that p53, in which nuclear export domain was mutated, exclusively resides in the nucleus and was unable to repress autophagy. Overall, this work demonstrated that the p53 anti-autophagic effect is exclusively linked to its cytoplasmic localization⁷. Our work however indicates that the situation is likely not so simplistic. Thus, we clearly demonstrate by combined and complementary approaches that p53 can also repress autophagy, ex-vivo and in vivo, via the transcriptional down-regulation of PINK-1, a well characterized pro-autophagic effector ²⁴. Thus, nuclear p53 can also trigger an anti-autophagic phenotype. The discrepancy between our work and that of Tasdemir may be linked to the fact they investigated the impact of nuclear p53 on "non-selective" macro-autophagy and several players of the AMPK/mTOR axis. Our data show that nuclear p53 may thus have an additional role PINK1-dependent control of "selective" mitochondrial autophagy. Furthermore, since transcriptional regulation may be cell type specific, one cannot exclude the possibility that in Tasdemir et al., the use of p53-deleted human colon adenocarcinoma cells could have precluded the delineation of additional p53-dependent transcriptional pathways repressing autophagy.

Several lines of evidence indicate that mitophagy could well be controlled by an intricate functional interplay linking parkin, p53 and PINK1. First, there exists a feed-back loop by which, parkin transrepresses p53⁹, which conversely, up-regulates parkin transcription¹¹. This interplay has functional consequences where PINK1 plays a key role. Thus, cytoplasmic p53 affects parkin translocation to the mitochondria, enabling its interplay with PINK1 and thereby, elimination of malfunctioning mitochondria by mitophagy²⁵. Numerous studies have documented the functional relationship between parkin and PINK1. This led to the consensus that parkin acts as a privileged downstream effector of a cascade by which PINK1 controls mitochondrial homeostasis and elimination of flawed mitochondria by selective autophagy ²⁶. Breaking this dogma, we very recently showed that parkin could also act upstream to PINK1 to regulate its transcription and pro-mitophagic function (Goiran et al. Submitted). Overall, this highlights multiple pathways by which p53 could control autophagy, including yet unraveled transcriptional repression of PINK1 underlying an additional function of nuclear p53 as an autophagic repressor.

Given that p53 expression and function is altered in both neurodegenerative diseases and cancer and, according to the fact that both pathologies are characterized by drastic alterations of autophagic processes, one can envision that either gain (neurodegenerescence) or loss (tumogenicity) of function of p53 could directly influence PINK1 function and thereby, could contribute to the anatomical stigmata and clinical pictures observed in these pathologies.

MATERIALS AND METHODS

Cellular and animal models.

Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), Human Colorectal adenocarcinoma (HCT116), SH-SY5Y human neuroblastoma and human embryonic kidney (HEK293) cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Immortalized mouse embryonic fibroblasts invalidated for TP53 or for TP53 and p19^{arf} genes were kindly provided by Dr. M. Roussel (St. Jude Children's Research Hospital Memphis, TN, USA) whereas the human colorectal carcinoma cell lines HCT116 invalidated or not for p53 were provided by Dr. JC Bourdon (University of Dundee, Dundee, UK). HAP1 cells purchased from Horizon Genomics (HAP1 PINK1^{+/+}) is a haploid human cell line that was derived from KBM-7 cells ²⁷. HAP1 clone 798-8 (HAP PINK1^{-/-}) was engineered using CRISPR/cas9 and contains one base insertion in exon 2 leading to a frame-shift PINK1 coding sequence. HAP1 cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml).. TP53 knockout mice have been provided by Dr. M. Serrano (Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Spain).

Pharmacological modulation of p53.

The pharmacological modulation of p53 was obtained after 16 hours incubations with etoposide (150 μ M), pifithrin- α (10-30 μ M) leptomycin (10nM) purchased from Sigma. The pharmacological modulation of PINK1 was obtained after 8 hours incubations with CCCP (10 μ M) purchased from Sigma. After treatments, cells were recovered and protein and RNA analyses were monitored as described below. For the analysis of the impact of these drugs to

PINK1 promoter activity, cells were transiently transfected with the promoter of PINK1 coupled to the luciferase reporter gene (see Luciferase-based reporter assays section) and 24 hours post-transfection submitted to the above described treatment.

Western-blot protein analysis.

Cells and mouse brains were lysed in Prusiner's buffer (Tris-HCl 1M; pH 7.5 containing NaCl (150mM), EDTA (5mM), Triton X100 (0.5%), deoxycholate and protease inhibitor cocktail) and the homogenates obtained briefly sonicated. Aliquots of 50µg of total protein were loaded to (8-16%) SDS-PAGE gels. After migration, proteins were wet-transferred to Hybond C membranes (Amersham Life Science) and immunoblotted using anti-PINK1 C-terminal (BC100-494, Novus and AC-R3173-2 Abiocode), anti-p53 (CM1, provided by J.C. Bourdon), anti-LC3 (NB100-2220, Novus), anti-p62/SQSTM1 (NBP1-49956) and anti-actin (clone AC-74, A5316, Sigma) antibodies. Immunological complexes were revealed with either anti-rabbit or anti-mouse IgG-coupled peroxidase antibodies (Jackson ImmunoResearch) by the electrochemiluminescence detection method (Roche Diagnostics S.A.S). Chemiluminescence was recorded using a luminescence image analyzer LAS-4000 (Raytest, Fuji) and quantifications of non-saturated images were performed with the FUJI Film Multi Gauge image analyzer software.

Plasmid constructs and ex-vivo transfection.

Human and mouse full length and mouse 5'end-truncated Pink-1 promoter-luciferase constructs have been previously described ²⁸. The pGL3 vector containing the mouse Pink-1 promoter served as a template to generate the promoter deleted of the 5'-CCAG-3' nucleotides. This deleted motif constitutes part of the 5' half-site of p53 putative binding site, 5'-<u>CCAG</u>ctgcac<u>CAAG</u>-3', located from nucleotides -167 to -154 upstream of mPINK1 ATG start codon. The primers used were 5'- GGT TCA AAG TGC AAA CTG CAC CAA GGG

ATG -3' (forward primer) and 5'- CAT CCC TTG GTG CAG TTT GCA CTT TGA ACC -3' (reverse primer). The plasmids GFP-p53 and GFP-p53 NES- were a gift from Tyler Jacks (Addgene plasmids # 12091 and 12092). We used the GFP-p53 vector to generate with the mutagenesis kit QuickChange II (Stratagene) the GFP-p53NLS mutant (mutation of the 280-282 KKK sequence of p53 nuclear localization signal (NLS) in AAA). The following forward and reverse mutagenesis primers: 5-TCC TCT CCC CAG CCA GCG GCG GCA CCA CTG GAT GGA GAA TA T-3' and 5'-ATA TTC TCC ATC CAG TGG TGC CGC CGC TGG CTG GGG AGA GGA-3' purchased from Eurogentec were used. All the constructs were verified by full sequencing. Transient transfections of the various cells systems cells were carried out by means of lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Luciferase-based reporter assays.

The transactivation of the wild-type (human and mouse) and mutated Pink-1 mouse promoter described in the plasmid constructs section was followed by recording the luciferase reporter gene activity 24 hours after co-transfection of 1 μ g of the above cDNAs and 0,5 μ g of β galactosidase cDNA (in order to normalize for transfection efficiencies) by means of lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). When necessary, in a subset of experiments, 0,5-1 μ g of empty pcDNA3.1, wild type or mutated p53 were co-transfected.

RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR analysis.

RNA from cells and RNA later (Qiagen) stabilized mouse brains were extracted and treated with DNAse using RNeasy or RNeasy Plus Universal Mini kits respectively following manufacturer's instructions (Qiagen). Two µg of total RNA were reverse transcribed

(GoScript Reverse Transcriptase, Promega) using Oligo-dT priming. Then, samples were subjected to real-time PCR by means of a Rotor-Gene 6000 apparatus (Qiagen), using the SYBR Green detection protocol. Gene-specific primers were designed with the Universal Probe Library Assay Design Center software (Roche Applied Science). Relative expression levels of human Pink-1 (forward 5'-CGA-GGA-ACT-CGT-TTG-AAG-GG-3'; reverse 5'-CCA-GGT-GGC-AAA-TCA-GAC-ATG-3'), mouse Pink-1 (forward 5'-CGC-CTA-TGA-AAT-CTT-TGG-GC-3'; reverse 5'-GCA-CTG-CCT-TGG-CCA-TAG-AA-3'), amplification products were normalized for RNA concentrations with human Topoisomerase 1 (forward 5'-CCC-TGT-ACT-TCA-TCG-ACA-AGG-3'; reverse 5'- CCA-CAG-TGT-CCG-CTG-TTT-C-3'), mouse Topoisomerase 1 (forward 5'-TGC-CTC-CAT-CAC-ACT-ACA-GC-3'; reverse 5'-CGC-TGG-TAC-ATT-CTC-ATC-AGG-3') and human GAPDH (forward 5'-AGC-CAC-ATC-GCT-CAG-ACA-C-3'; reverse 5'-GCC-CAA-TAC-GAC-CAA-ATC-C-3') and mouse GAPDH (forward 5'-TGT-CCG-TCG-TGG-ATC-TGA-C-3'; reverse 5'-CGT-GCT-TCA-CCA-CCT-TCT-TG-3') housekeeping genes.

Adenovirus-mediated p53 overexpression in mouse brain.

C57BL6 mice were purchased from Charles River Laboratories (France) and maintained at 21°C on a 12 hours light and 12 hours dark cycle. Animal care procedures were in accordance with the guidelines established by the European Community Council directives (86/609/EEC). C57BL6 adult males were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg of body weight; Ketamine 1000; Ceva) and xylazine (10 mg/kg of body weight; Rompun 2%; Centravet) dissolved in 0.9% sterile saline, and positioned in a stereotaxic frame. Eight animals per group were injected into the striatum, using appropriate coordinates (1 mm anterior to the bregma, 2 mm lateral, 3 mm deep from the skull surface) with either eGFP adenovirus or adenovirus expressing human p53 and GFP $(10^7 \text{ PFU} \text{ in each hemisphere}; \text{Vector Biolabs}, Philadelphia, PA, USA).$ Animals were sacrificed 10 days after injection. Proteins and mRNA were extracted and analyzed as described above. We did Western-blot analysis with the p53 CM1 antibody to show the expression of the injected p53 and GPF.

Statistical analysis.

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (www.graphpad.com for Windows, San Diego, California USA). All groups of samples analyzed by Student's t-test have passed a normality test to assure Gaussian distribution of values and precision concerning the type of test (unpaired versus paired and homoscedastic versus heteroscedastic) are provides in figures legends. Analysis of more than two groups of variables (normality test passed) was performed by One-way ANOVA with Newman-Keuls's post-hoc test. Significant differences are:*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 and ns = non significant.

Note: Supplementary Information is available in the online version of the paper

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Drs. JC. Bourdon, M. Oren, B. Vogelstein, M. Roussel and M. Serrano for providing both valuable constructs and cellular and animal models. This work was supported by "Conseil Général des Alpes Maritimes" and the Foundation Claude Pompidou. This work has been developed and supported through the LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to ALZheimer's disease. Thomas Goiran is funded by the "LIGUE contre le Cancer".

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Legends to Figures

Figure 1. Pharmacological modulation of p53 impacts PINK1 trancription.

Figure 1 Modulators of p53 transcriptional activity modulate PINK1 trasncription.

SH-SY5Y cells were treated with vehicle (CT), etoposide (ETO, 150µM, 16h) or pifithrin-alpha (PFT, 10µM, 16h) then PINK1 protein (**a,d**), promoter activity (**b**) and mRNA levels (**c,e**) were analyzed as described in the Methods section. p53 and actin immunoreactivities are provided as read-out of p53 activation and gel loading controls respectively (**a,d**). Bars represent the means \pm SEM of 4 independent experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of vehicle-treated control cells. Statistical analyses were performed with GraphPadPrism software by using unpaired Student's t-test. Significant differences are: *p< 0.05, **p< 0.01, ***p<0.001.

Figure 2. Overexpressed and endogenous p53 repress PINK1 transcription.

SH-SY5Y cells transiently transfected with an empty vector (EV, white bars) or wild-type p53 cDNA (p53, black bars) were assessed for PINK1 protein (**a**), promoter activation (**b**) and mRNA levels (**c**). PINK1 protein levels in basal (-, white bars) and CCCP (+, black bars, 10μ M/6h) stress condition were analyzed in control (p53^{+/+}, black bars) or p53-deficient (p53^{-/-}, white bars) HCT116 cells (**d**). PINK1 promoter transactivation (**e**) and mRNA levels (**f**) were analyzed in control (p53^{+/+}, black bars) or p53-deficient (p53^{-/-}, white bars) HCT116 cells (**d**). PINK1 promoter transactivation (**p**) and mRNA levels (**f**) were analyzed in control (p53^{+/+}, black bars) or p53-deficient (p53^{-/-}, white bars) HCT116 cells in basal conditions as described in the Methods section. p53 and actin protein levels as are provided in **a** and **d** as transfection and protein charge controls. HCT116 p53-deficient (p53^{-/-}) cells transiently transfected with an empty vector (EV, white bars) or wild-type p53 cDNA (p53, black bars) were assessed for PINK1 promoter transactivation (**g**) and mRNA levels (**h**). Bars in represent the means ± SEM of 3-4 independent experiments performed in duplicates or triplicates and are expressed as percentage of control EV (**a-c, g,h**) or p53^{+/+}

cells (**d-f**). Statistical analyses were performed with GraphPadPrism software by using unpaired Student's t-test. Significant differences are: *p<0.05, **p<0.01, and ****p<0.0001.

Figure 3. p53 represses PINK1 transcription via its DNA binding properties.

Upper panel (**a**) represents the 5' deletion constructs of the full-length (FL) mouse PINK1 promoter region. The PINK1 promoter constructs described in (**a**) (upper scheme) were co-transfected with the β -galactosidase reporter gene and either empty vector (EV, white bars) or wild-type p53 (p53, black bars) cDNA in HEK293 cells and then luciferase activity was measured as described in Methods. Upper panel (**b**) represents the two potential p53-responsive elements (-296/-285 and -167/-154) on the shorter 0.4Kb-luciferase PINK1 promoter construct. PINK1 promoter constructs 0.4Kb wild-type (0.4) or deleted from the -167/-164 sequence (0.4 Δ) were co-transfected with the β -galactosidase reporter gene and either empty cDNA (EV, white bars) or wild-type p53 (p53, black bars) cDNA, then luciferase activity was measured as described in Methods. Representative gels of p53 expression and actin as transfection efficiency and gel charge controls are provided in (**a**) and (**b**). Bars represent the means ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicates and are expressed as percentage of control (FL, 0.4) EV transfected cells. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software by using unpaired Student's t-test. Significant differences are: *p< 0.05, **p< 0.01, ***p<0.01.

Figure 4. Impact of the pharmacological and genetic modulation of p53 localization on PINK1 transcription.

(**a-c**) PINK1 protein expression (**a**), promoter activation (**b**) and mRNA levels (**c**) were analyzed in SH-SY5Y cells treated with vehicle (CT) or with leptomycin (LM) as described in the

Methods. (d) Immunohistochemical analysis of GPF-tagged p53 constructs versus DAPI nuclear labeling showing the presence of wild-type p53 (WT) in the nucleus and cytoplasm, p53 NES mutant (L22Q,W23S p53, NESm) in the nucleus and p53 NLS mutant (K280-282A p53, NLSm) in the cytoplasm. (e,f) SH-SY5Y cells transiently transfected with empty vector (EV), wild-type p53 (WT), p53 NES mutant (NESm), or p53 NLS mutant (NLSm) and then assessed for PINK1 promoter activity (e) and mRNA levels (f). p53 (e,f) and actin immunoreactivities (a,e,f) are provided as read-out of p53 activation and gel loading respectively. Bars in (e) and (h) represent the means \pm SEM of 3-4 independent experiments performed in duplicates or triplicates and are expressed as percentage of vehicle-treated cells (a-c) or EV control cells (e-f). Statistical analyses were performed with GraphPadPrism software by using unpaired Student's t-test. Significant differences are: **p< 0.01, ****p< 0.0001 and ns= non-significant.

Figure 5. Endogenous p53 represses autophagy via PINK1.

(a) (LC3-2/LC3-1) and p62 protein levels were analyzed in control (PINK^{+/+}) or PINK1deficient (PINK^{-/-}) HAP cells treated with vehicle (Ct) or pifithrin- α (PFT, 30 µM) as described in the Methods. Bars in (b) and (c) represent the means ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicates and are expressed as percent of control HAP1 (HAP^{+/+}, Ct) cells. Actin expression is provided as a gel loading control in (a). Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software by using unpaired Student's t-test. Significant differences are: ns: not significant, *p< 0.05.

Figure 6. p53 controls PINK1 transcription in vivo.

(**a**,**b**) Effect of adenovirus-mediated wild-type p53 (Adp53, black bars) overexpression on PINK1 protein (**a**) and mRNA (**b**) levels compared to control virus (AdCt, white bars) in vivo as described in the Methods. Analyses of PINK1 protein (**c**) and mRNA levels (**d**) in control ($p53^{+/+}$, white bars) or TP53 gene invalidated ($p53^{-/-}$, black bars) in mouse brain samples as described in the Methods. Representative gels of PINK1, p53 (virus transduction efficiency) and actin (protein charge control) protein levels are provided in upper panels **a** and **c**. Bars represent the means ± SEM of 2 independent experiments performed quadruplicate and are expressed as percentage of control (AdCt, $p53^{+/+}$) mouse brain samples. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software by using unpaired Student's t-test. Significant differences are: *p< 0.05, and ***p<0.001.

References

- 1. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nat Rev Mol Cell Biol 2008, **9**(5): 402-412.
- 2. Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G. Autophagy regulation by p53. Curr Opin Cell Biol 2010, **22**(2): 181-185.
- 3. Sui X, Jin L, Huang X, Geng S, He C, Hu X. p53 signaling and autophagy in cancer: a revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. Autophagy 2011, **7**(6): 565-571.
- 4. Tang J, Di J, Cao H, Bai J, Zheng J. p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy. Cancer Lett 2015, **363**(2): 101-107.
- 5. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene 2004, **23**(16): 2891-2906.
- 6. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, et al. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. Cell 2006, **126**(1): 121-134.
- 7. Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. Nat Cell Biol 2008, **10**(6): 676-687.
- Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M, et al. A dual role of p53 in the control of autophagy. Autophagy 2008, 4(6): 810-814.
- 9. da Costa C, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A, et al. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. Nature Cell Biology 2009, **11**(11): 1370-1375.
- Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine A, et al. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2011, **108**(39): 16259-16264.
- 11. Viotti J, Duplan E, Caillava C, Condat J, Goiran T, Giordano C, et al. Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity. Oncogene 2014, **33**(14): 1764-1775.

- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat Genet 2000, 25(3): 302-305.
- Kondapalli C, Kazlauskaite A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gourlay R, et al. PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. Open Biol 2012, 2(5): 120080.
- 14. Shiba-Fukushima K, Imai Y, Yoshida S, Ishihama Y, Kanao T, Sato S, et al. PINK1mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. Scientific reports 2012, **2:** 1002.
- 15. Jin SM, Youle RJ. PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance. J Cell Sci 2012, **125**(Pt 4): 795-799.
- 16. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. Neuron 2015, **85**(2): 257-273.
- 17. Karpinich NO, Tafani M, Rothman RJ, Russo MA, Farber JL. The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochodrial release of citochrome C. J Biol Chem 2002, **277:** 16547-16552.
- 18. Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, et al. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effect of cancer therapy. Science 1999, **285**: 1733-1737.
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. PLoS Biol 2010, 8(1): e1000298.
- 20. Kudo N, Khochbin S, Nishi K, Kitano K, Yanagida M, Yoshida M, et al. Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. J Biol Chem 1997, **272**(47): 29742-29751.
- 21. Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, et al. Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. Exp Cell Res 1998, **242**(2): 540-547.
- O'Keefe K, Li H, Zhang Y. Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. Mol Cell Biol 2003, 23(18): 6396-6405.

- 23. Boyd SD, Tsai KY, Jacks T. An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. Nat Cell Biol 2000, **2**(9): 563-568.
- 24. Narendra D, Walker J, Youle R. Mitochondrial quality control mediated by PINK1 and Parkin: links to parkinsonism. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2012, **4**(11).
- 25. Hoshino A, Mita Y, Okawa Y, Ariyoshi M, Iwai-Kanai E, Ueyama T, et al. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. Nat Commun 2013, **4:** 2308.
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. Nature 2006, 441(7097): 1162-1166.
- 27. Essletzbichler P, Konopka T, Santoro F, Chen D, Gapp BV, Kralovics R, et al. Megabase-scale deletion using CRISPR/Cas9 to generate a fully haploid human cell line. Genome Res 2014, **24**(12): 2059-2065.
- 28. Mei Y, Zhang Y, Yamamoto K, Xie W, Mak TW, You H. FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. Proc Natl Acad Sci U S A 2009, **106**(13): 5153-5158.









0.4

EV p53 EVp53 EVp53 EV p53

0.8

1.3

FL

Mouse PINK1 promoter

I UC

EV p53

 0.4Δ

EV p53

0.4

b

Fig.3 Goiran et al.











Fig.6 Goiran et al.
p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional regulation

Goiran et al.

Figure S1. Impact of p53 knockdown to pink1 transcription.



Control mouse fibroblasts (MEF, p19^{arf-/-}, A-, white bars) or MEF devoid of p53 (p19^{arf-/-p53-/-}, AP-, black bars) were assessed for PINK1 promoter transactivation (**a**) and mRNA levels (**b**) in basal conditions as described in the Methods section. Bars represent the means ± SEM of 3-4 independent experiments performed in duplicates or triplicates and are expressed as percentage of control cells (A-, white bars). Statistical analyses were performed with GraphPadPrism software by using unpaired Student's t-test. Significant differences are: **p< 0.01.

DISCUSSION / CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La protéine PINK1 est une kinase dotée de nombreuses fonctions liées à sa localisation mitochondriale. Elle œuvre au maintien de l'homéostasie mitochondriale en controllant le processus de mitophagie. Un défaut de son activité se traduira par une perturbation du profil mitochondrial caractéristique d'une cellule « en bonne santé ». PINK1 a été identifiée comme un acteur majeur du développement de troubles neurodégénératifs associés à certaines formes familiales récessives de MP. Cependant, l'implication de PINK1 dans les formes sporadiques de PD ainsi que dans d'autres pathologies a été proposée.

La régulation de PINK1 dans la MA.

Nous décrivons pour la première fois, la mécanique cellulaire sous-tendant un lien fonctionnel entre PINK1 et la Préséniline 1 (PS1), une protéase contribuant vraisemblablement à l'étiologie de la MA (De Strooper et al., 1998; Wolfe and Haass, 2001).

Notre hypothèse première était basée sur des résultats montrant que PTEN, le premier facteur identifié en tant que régulateur de PINK1 (Matsushima-Nishiu et al., 2001), lui-même régulé directement par les PS (Zhang et al., 2008a). De plus, il avait été rapporté une localisation de PINK1 au niveau des plaques amyloïdes (Wilhelmus et al., 2011) et PTEN s'accumule dans les dégénérescences neurofibrillaires (Sonoda et al., 2010), deux sceaux anatomiques qui signent la MA.

PS1 régule de manière positive la transcription de PINK1, tandis que PS2 en réprimant PS1, régule négativement PINK1. Ce mécanisme est indépendant de PTEN. Ces résultats confirme le dialogue fonctionnel entre PS1 et PS2 qui se contrôlent respectivement, pouvant expliquer notamment le phénotype anti- et pro-apoptotiques de PS1 et PS2, respectivement (Alves da Costa et al., 2002).

Nous montrons que l'activité γ -sécrétase de PS1, via la génération d'un fragment AICD (Konietzko et al., 2010), régule transcriptionnellement et de manière positive les niveaux de PINK1.

L'induction de PINK1 par l'intermédiaire d'AICD in vivo est en accord avec l'augmentation dépendante de l'âge, du niveau protéique et d'ARNm de PINK1 de cerveaux de souris « alzheimers » 3xTgAD et la hausse d'AICD (Lauritzen et al., 2012). De même, les niveaux

de PINK1 sont augmentés dans un modèle de souris transgéniques surexprimant stablement l'AICD (Ghosal et al., 2009).

La régulation de PINK1 par PS1 est bloquée par les inhibiteurs de γ -sécrétase, suggérant l'implication de sa fonction catalytique. En revanche, il a été montré que la modulation de PTEN par les PS due à l'activité enzymatique, de PS1, ce qui est en accord avec notre observation d'une modulation de PINK1 dépendante de la γ -secretase et indépendante de PTEN (Zhang et al., 2008a).

De manière intéressante, une étude développée au laboratoire a permis de mieux comprendre l'activité de clivage des complexes γ -sécrétases. Les complexes γ -sécrétases sont composés de 4 membres dont 2, APH-1 et PS possèdent plusieurs isoformes. L'association de différents variant de chaque sous-unités du complexe γ sécrétase permet théoriquement, la génèse de six complexes γ -sécrétases (De Strooper, 2003; Sherrington et al., 1995; Edbauer et al., 2003). La composition précise du complexe γ -sécrétases en plus d'impacter sa localisation dans les compartiments cellulaires (Meckler and Checler, 2016), peut conditionner la production et la localisation d'AICD. Cette localisation différentielle d'AICD aura comme conséquence de promouvoir son activité transcriptionnelle, ou sa dégradation (Belyaev et al., 2010; Kametani et al., 1993).

De plus, il a été décrit une production d'AICD au cours des deux voies de protéolyse de la β APP (Kume et al., 2004). La voie non amyloïdogénique, (couple α et γ sécrétase), la voie amyloïdogénique (couple β et γ sécrétase), produit de l'AICD dans la voie endosomale (Sannerud et al., 2011). Cette hypothèse est corroborée par d'autres études qui suggèrent que l'AICD viendrait majoritairement de la voie amyloïdogénique et de la β sécrétase (Belayev et al., 2010 ;Goodger et al., 2009).

L'AICD est un facteur de transcription, capable de moduler la transcription de nombreux gènes (Beckett et al., 2012; Konietzko, 2012; Pardossi-Piquard and Checler, 2012). Cette capacité est portée par la capacité de l'AICD à interagir avec des modulateurs ou des co-facteurs nucléaires. Le facteur de transcription FOXO3a capable de réguler positivement PINK1 (Mei et al., 2009) fait partie de ces co-facteurs identifiés. Ils interagissent physiquement dans le cytoplasme, pour être transloqués conjointement au cœur du noyau en réponse à un stress oxydatif induisant la transcription de facteurs pro-apoptotiques (Wang et al., 2014).

Il est important de noter, que FOXO3a est exprimé à des niveaux élevés dans la MA (Manolopoulos et al., 2010; Sanphui and Biswas, 2013), notamment en réponse à l'augmentation du stress oxydatif décrit dans la MA. Cette intensification de la voie FOXO3a corrèle avec le niveau élevé de PINK1 au cours de la MA. En revanche, elle soulève la question de la place positive ou négative de PINK1 au sein de la réponse apoptotique, étant initialement décrite comme un facteur neuroprotecteur (Petit et al., 2005) et par conséquent, celle de l'AICD.

En effet, très peu d'études ont été réalisées ou reste encore débattue concernant le rôle exacte de l'AICD dans la progression ou non de la MA. De nombreuses cibles transcriptionnelles de l'AICD ont été identifiées (Beckett et al., 2012; Konietzko et al., 2010; Müller et al., 2008; Pardossi-Piquard and Checler, 2012). Des études au laboratoire ont révélé que le facteur de transcription pro-apoptotique p53 était une cible transcriptionnelle d'AICD (Alves da Costa et al., 2006). Les mutations de PS1 associées à la MA causent une augmentation de p53 (Bialopiotrowicz et al., 2012) ou abolissent la fonction protectrice de PS1 (Alves da Costa et al., 2002). Cette régulation suggère le caractère apoptotique de l'AICD, et rejoint cette hypothèse auparavant proposé, au regard de sa régulation de FOXO3a (Wang et al., 2014).

L'augmentation de PINK1 reflète-t-elle un mécanisme délétère ou bénéfique/compensatoire ? Cette augmentation résultant de mutations et/ou de dérèglements pathologiques pourrait être un moyen mis en place par la cellule, comme cela a été montré pour la protéine DJ-1 (Baulac et al., 2009; Choi et al., 2006), de lutter contre le stress oxydatif caractéristique de la MA. Un tel mécanisme potentiellement protecteur est en accord avec des données précédentes montrant qu'AICD peut réguler l'APP lui-même (Rotz et al., 2004). En effet dans les cas sporadiques et familiaux de la MA, l'expression de l'AICD est augmentée soit par sa faible dégradation liée à la réduction de l'expression de son enzyme de dégradation IDE (Cook et al., 2003), soit par l'augmentation de sa production due aux mutations de PS1 ou de l'APP (Checler, 1995). Cet accroissement de l'AICD, illustre l'augmentation du niveau de PINK1, qui en condition physiologique protège les mitochondries. De plus, plusieurs protéines impliquées dans la production et la dégradation de l'A^β, à l'instar de la NEP (Belyaev et al., 2009; Pardossi-Piquard et al., 2005; Xu et al., 2011), l'enzyme majeur de dégradation de l'Aβ, ou de la β sécrétase (Rotz et al., 2004) lui procurant, dans un contexte physiologique normal, un effet protecteur. Il a été décrit une dégradation préférentielle des formes de peptide Aβ40 par la NEP. En effet, dans les conditions normales, le niveau d'Aß est donc maintenu à bas niveau. Néanmoins, dans les formes familiales de MA, cette meilleure affinité de la NEP pour les formes d'A β 40 peut contribuer à l'augmentation pathogène du rapport des formes A β 42/A β 40.

Le cas de la NEP nous fournit donc un exemple d'une cible, s'avérant au départ bénéfique, mais qui en fonction de sa balance d'induction/réduction et selon le contexte physiologique ou non, contribuera à un processus délétère (Pardossi-Piquard et al., 2005).

Nous avons établi la relevance et l'impact du contrôle de PINK1 par AICD sur les fonctions mitochondriales associées à PINK1. Nous montrons que la modulation de PINK1 par l'AICD est associée aux changements du potentiel mitochondrial ainsi que de l'expression des marqueurs autophagiques et que ces fonctions identifiées de l'AICD, sont dépendantes de PINK1. Il en découle que la diminution de PINK1 occasionne l'inactivation fonctionnelle des mitochondries, concordant avec la fonction physiologique de PINK1 dans le contrôle qualité et la protection des mitochondries (Yu et al., 2011). Ainsi, nous montrons que la surexpression d'une forme d'AICD nucléaire, induit l'autophagie de manière dépendante de PINK1 comme précédemment évoqué dans la littérature (Narendra et al., 2008b; Vives-Bauza et al., 2010).

Ces résultats suggèrent un phénotype pro-autophagique de l'AICD, dépendant de PINK1, qui pourrait expliquer le niveau élevé d'induction autophagique, illustré par l'accumulation de vacuoles autophagiques caractéristiques des cerveaux de patients MA (Baloyannis, 2006; Moreira et al., 2007a, 2007b; Trushina et al., 2012).

PINK1 contrôle la fragmentation mitochondriale dans les neurones hippocampaux (Yu et al., 2011) en recrutant la parkine en vue de la dégradation mitophagique des mitochondries endommagées (Matsuda et al., 2010). Le consensus prévalant propose PINK1 comme un effecteur en amont de la parkine.

Comme attendu, l'invalidation de PINK1 dans nos modèles cellulaires, entraine l'accumulation du niveau protéique de Mfn2 et Drp1. Ce phénotype pourrait refléter une diminution du recrutement et de l'activité E3 ubiquitine ligase de la parkine (Gegg et al., 2010; Wang et al., 2011a). Inversement, l'expression d'AICD réduit l'expression de Drp1 et Mfn2 de manière dépendante de PINK1. Ces résultats montrent que la production d'AICD par la γ -sécrétase, module la mitophagie et la dynamique mitochondriale de manière dépendante de PINK1, et contrôle la qualité des mitochondries.

De manière spéculative, l'induction de l'autophagie pourrait être un mécanisme précoce protecteur afin de lutter contre les effets délétères observés dans la MA (Schaeffer et al., 2012), tels que le stress oxydatif (Christen, 2000) et l'accumulation des agrégats protéiques. Plus tardivement, l'induction chronique de l'autophagie conduit à une accumulation des AVs et de leurs contenus par défaut de leur dégradation (Boland et al., 2008; Ditaranto et al., 2001; Ling et al., 2009; Yang et al., 1998; Zheng et al., 2009). Cette accumulation sera donc in fine, délétère et contribuera à l'accumulation de peptide A β (Nixon, 2007; Yu et al., 2005). De manière spéculatie, les AVs en englobant les organelles dotées de toute la machinerie sécrétases qui pourraient participer au clivage de l'APP.

Au niveau mitophagique, une activation accrue de PINK1, mènera vers une dégradation accrue des mitochondries, se révélant finalement délétère pour la cellule, la menant à son apoptose. Ce déséquilibre de PINK1, incarné par un affaiblissement à la fois de la fission et de la fusion mitochondriale pourrait impacter le renouvellement, le contrôle-qualité des mitochondries et de cette manière leur homéostasie.

Finalement, notre étude permet de montrer pour la première fois les mécanismes de dérèglement de PINK1 dans la MA et d'identifier ceux responsables du dysfonctionnement mitochondrial reporté dans la MA. Elle permet par ailleurs, de mettre en évidence des liens moléculaires et fonctionnels entre les différentes maladies neurodégénératives. Dans la même veine, une étude menée dans le laboratoire et à laquelle j'ai participé (annexe 1), a montré de manière remarquable une régulation de PS1 (positive) et de PS2 (négative) par la parkine (Duplan et al., 2013). C'est cette étude qui nous a initialement inspiré pour montrer le lien original entre la parkine, les PS et PINK1.

D'autres exemples de protéines participant à l'étiologie de la MP impliquées dans d'autres désordres neurologiques (Wilhelmus et al., 2011) comme la parkine (Lonskaya et al., 2013a), l' α -synucléine (Spillantini et al., 1997) ou DJ-1 (Choi et al., 2006), soulignent le dialogue entre pathologies diverses via des protéines initialement considérées comme des acteurs exclusifs d'une pathologie.

Conclusion PINK1 dans la MA



Figure 28 : Schéma récapitulatif de la cascade moléculaire reliant les PS et PINK1 Un trouble en amont de la cascade moléculaire, au niveau des PS (MA) ou de la parkine, entrainera une dérégulation de l'expression de PINK1 qui se répercutera sur ses fonctions mitochondriales. L'augmentation de la Parkine ou de l'activité catalytique de PS1 entrainera une production accrue d'AICD qui augmentera avec FOXO3a la transcription de PINK1.

En condition pathologique, l'exacerbation de cette cascade moléculaire concernant la parkine, les PS, l'AICD et PINK1, se traduira par une induction mitophagique accrue et une accumulation des mitochondries dans les compartiments défaillants de dégradation lysosomale, contribuant au gonflement des neurones ainsi qu'à la mauvaise localisation des mitochondries et donc à la mauvaise répartition énergétique au sein des neurones, menant ces derniers à une mort précoce.

Perspectives :

Dans ce cas précis, un seul modulateur direct de PINK1 représenté par de petites molécules activatrices de PINK1 et toujours en phase de recherche, a été développé par un laboratoire pharmaceutique « Mitokinin LLC ». La MP étant caractérisée par un défaut des fonctions de PINK1 (Valente et al., 2004a), le rationnel au sujet de l'utilisation de ces molécules est basé

sur l'hypothèse que l'augmentation de l'activité de PINK1 puisse remédier les problèmes mitophagiques observés dans la MP.

Pourtant au vu de nos études, le premier réflexe porte à soutenir l'idée que l'inhibition du niveau de PINK1 pourrait grandement impacter le développement de la maladie. Ceci, en outre en contrecarant l'effet délétère de ses fonctions suite à sa dérégulation moléculaire par AICD.

Toutefois cette idée a déjà été indirectement expérimentée. En effet, les premiers essais thérapeutiques avaient pour but de diminuer la production de l'A β , en ciblant la γ -sécrétase. Malheureusement, ces essais furent un échec suite à l'appartition de nombreux effets secondaires (De Strooper, 2014; Doody et al., 2013; Mikulca et al., 2014). Aujourd'hui, nous comprenons que l'inhibition de la γ sécrétase, en plus d'influencer des grandes voies de signalisations cellulaires aura des répercussions au niveau de la voie mitochondriale et de l'autophagie.

PINK1 et cancer

Nous avons établi un effecteur commun entre PINK1 et p53. De manière logique nous nous sommes intéressés, en premier lieu, à l'implication de PINK1 au sein de tumeurs cérébrales, les gliomes (résultats présentés dans les chapitres suivants

<u>Figure 32</u> et <u>Figure 33</u>).

Une étude à laquelle j'ai participé (Annexe 2) a établi que la parkine est régulée transcriptionnellement par p53. Son expression est inversement corrélée avec le grade de la tumeur (Viotti et al., 2014).

A travers ce fil conducteur, nous démontrons pour la première fois une inhibition transcriptionnelle de PINK1 par p53 représentant la modulation claire d'une cible promitophagique de p53.

La plupart des études documentent un effet pro-autophagique de p53 par la transactivation des gènes de la machinerie autophagique (Amaravadi et al., 2007; Crighton et al., 2006a, 2006b, Feng et al., 2005, 2007). Toutefois, l'invalidation de p53 augmente l'autophagie (Tasdemir et

al., 2008a). Tasdemir et son équipe, ont décrit une induction de l'autophagie suite à l'utilisation d'inhibiteurs de p53.

De manière similaire, nous montrons grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de p53 la pifithrine- α , une augmentation de l'activité du promoteur, du niveau d'ARNm et du niveau protéique de PINK1. Nous confirmons ces résultats grâce à une stratégie d'invalidation génétique de p53. Ces résultats sont en accord avec Tasdémir et al. et complètent cette étude en identifiant en plus l'intermédiaire moléculaire, PINK1.

Néanmoins, nous obtenons une diminution de l'activité du promoteur, du niveau d'ARNm et du niveau protéique de PINK1, après l'utilisation d'un activateur de p53, l'étoposide ou par une approche de surexpression génétique de p53 soulevant de nombreuses questions sur un potentiel effet inhibiteur transcriptionnel de p53 sur PINK1.

Suite à cela, nous nous sommes donc intéressés à l'activité facteur de transcription de p53 directement modulé par sa localisation. De cette manière, nous montrons que la modulation pharmacologique de la localisation de p53 suite à l'utilisation de la leptomycine, un inhibiteur de l'export nucléaire de p53, ou génétique par l'intermédiaire de constructions simulant la séquestration de p53 dans le noyau ou dans le cytoplasme, favorise ou abolit son effet inhibiteur, respectivement, sur PINK1.

Nous identifions une partie des éléments de réponse à p53 situés sur le promoteur de PINK1 murin, précisant un lien physique direct de p53 sur PINK1.

C'est résultats sont importants puisqu'ils mettent en lumière le premier gène proautophagique réprimé par l'activité transcriptionnelle de p53 et identifient PINK1 en tant qu'acteur principal d'un effet anti-autophagique transcriptionel.

Il est difficile d'évaluer l'impact de la régulation de p53 sur les processus autophagiques. La forme de p53 nucléaire transactive des gènes autophagiques, tout en inhibant la transcription de PINK1 associé à la mitophagie. De plus, la régulation négative de PINK1 par p53 paraît paradoxale vis-à-vis de la régulation positive de la parkine (anti-apoptotique) par p53. Toutefois, la découverte d'une voie mitophagique indépendante de la parkine (et de p62) nous éclaire un peu plus sur la proportion de PINK1 et de la parkine dans l'induction de la mitophagie et de leur régulation respectives par p53. Cette voie indépendant de la parkine, peut être directement menée par PINK1, et la phosphorylation des protéines et des ubiquitines de l'OMM, permettant ainsi la fixation et le recrutement des récepteurs mitophagiques OPTN



et NDP52 (Lazarou et al., 2015). Nous montrons que l'activation de p53 par l'etoposide, entraine une diminution du potentiel mitochondrial dépendante de PINK1 (**Figure 29**).

<u>Figure 29</u> : Impact de la modulation de p53 sur le potentiel mitochondrial en fonction de PINK1

Traitement de cellules SH-SY5Y controles (PINK^{+/+}) ou exprimant stablement un SHrna PINK (PINK^{/-}) avec un véhicule (CT) ou avec l'étoposide (150 μ M, 16h, ETO). L'activation de p53 diminue le potentiel mitochondrial. Cette diminution est perdue dans un modèle d'invalidation de PINK1.

Conclusion :



Figure 30 : Schéma récapitulatif de la régulation trancriptionnelle de PINK1 par p53 La protéine p53 inhibe transcriptionnellement l'expression de PINK1. p53 cytosolique perd cette activité inhibitrice de PINK1. Les formes mutées de p53 souvent caractérisées par une altération de sa localisation ou la perte de son activité transcriptionnelle mèneront donc à une perte de sa fonction inhibitrice de PINK1 et donc, à une augmentation du niveau de PINK1.

Le lien entre p53 et PINK1 suppose une dérégulation potentielle de PINK1 lors de la tumorigénèse, et renforce le postulat d'un impact majeur de l'autophagie dans l'étiologie des cancers et identifie à la fois PINK1 et ses dysfonctions autophagiques associées comme cibles thérapeutiques possibles pour les pathologies cancéreuses.

Perspectives

A l'heure actuelle, il est difficile de comprendre de manière claire, l'impact de l'autophagie dans la biologie des cancers. Des études révèlent un effet anti-tumoral de l'autophagie quand d'autres décrivent un effet pro-tumoral (Chen and Debnath, 2010; Kondo et al., 2005; Rosenfeldt and Ryan, 2009). Ces effets pourraient être dépendants du type et du grade de la tumeur. L'autophagie empêcherait la transformation des cellules saines en cellules cancéreuses. Cependant, une fois la tumeur établie, l'autophagie deviendra un processus d'accentuation du développement tumorale.

Dans ce contexte, nos résultats faisant l'objet d'un article en cours de finalisation, concernant la régulation de PINK1 par p53 peuvent aider à comprendre l'origine des désordres mitochondriaux dans les cellules cancéreuses.

La régulation de PINK1 par PTEN et FOXO deux acteurs dérégulés dans les cancers, renforce cette hypothèse. D'un point de vue thérapeutique, l'expression de FOXO induit une sensibilisation des cellules cancéreuses aux agents thérapeutiques (Su et al., 2011; Sunters et al., 2003), dans laquelle PINK1 a également été impliquée. De manière déroutante, PINK1 a été directement associé dans la chimiorésistances cancéreuses (MacKeigan et al., 2005). C'est ainsi que d'autres études ont décrit une susceptibilité accrue des cellules cancéreuses aux dommages de l'ADN en absence de PINK1(Martin et al., 2011)

Les cancers sont souvent caractérisés par une mutation perte de fonction de p53. Cette perte de fonction transcriptionnelle se traduit par une augmentation d'expression de PINK1 illustrée et un niveau mitophagique élevé. Nous validons cette hypothèse grâce à l'utilisation d'une construction mutée de p53, la mutation « Hot Spot», p53 R175H (p53R175H) qui représente un site de mutation fréquemment retrouvé dans les cancers humains (Lang et al., 2004; Oren and Rotter, 2010). Cette mutation de p53, abolit son activité de facteur de transcription et explique sa perte de sa fonction suppresseur de tumeur directement associée au cancer (Liu et al., 2010)



Figure 31 : Etude des effets d'une mutation « Hot spot » de p53 *in-vivo* Délivrance d'un Adénovirus exprimant une forme sauvage ou mutée de p53 par injections stéréotaxiques dans les cerveaux de souris sauvages. La surexpression d'une forme de p53 sauvage (p53wt) diminue l'expression de la protéine et des ARNm de PINK1. La surexpression d'une forme de p53 mutée (p53R175H) abolit l'effet inhibiteur de p53.

Comme attendu, nous observons dans nos résultats préliminaires, une inhibition de PINK1 par p53 dans nos modèles cellulaires (résultats non montrés), comme dans nos modèles de souris ayant subi une injection stéréotaxique de virus exprimant la construction mutée de p53 (<u>Figure 31</u>). Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une dérégulation de PINK1 dans les cancers, puisque p53 est mutée dans plus de 50% des cancers humains (Lane, 1992; Levine, 1997; Soussi and Wiman, 2007).

C'est dans ce but que nous avons examiné les niveaux de PINK1 dans diverses lignées de gliomes. Ces tumeurs représentent les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et agressives, caractérisées dans la majorité des cas, par une mutation de p53 et de ses fonctions. De nombreuses mutations ont été découvertes et peuvent être consultées sur la base de données en ligne : IARC : <u>http://p53.iarc.fr/</u> (Petitjean et al., 2007). Une des mutations les plus courantes est la mutation décrite précédemment p53 R175H. De plus, l'étiologie de ces cancers reste encore peu connue et il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitements efficaces, ce qui rend leur issue fatale. En 2011, une équipe a mis en évidence l'existence d'une série de mutations somatiques de la parkine dans des échantillons de gliomes humains (Veeriah et al., 2010). Ces différentes mutations touchent les mêmes zones et parfois les mêmes résidus que ceux caractérisés dans la MP.



Nous montrons que le niveau d'expression de l'ARNm de PINK1 est augmenté dans les différentes lignées de gliomes définies présentant une forme de p53 mutée, (dans la majorité la forme p53R175H) comparativement à une lignée cellulaire contrôle comportant une forme de p53 sauvage.

<u>Figure 32</u> : Niveau d'expression d'ARNm de PINK1 dans plusieurs lignées cellulaires de gliomes

Le niveau d'ARNm de PINK1 est augmenté dans les lignées de gliomes (GL15, 8MG et 42MG) comparativement aux cellules contrôles (SH-SY5Y).

Nous avons conforté les résultats obtenus avec les cellules tumorales par l'examen des niveaux de PINK1 dans des gliomes de différents grades.

Les gliomes sont classés selon 4 grades : I, II, III, IV. Cette classification est issue de l'étude l'anatomo-pathologique du tissu après biopsie (Louis et al., 2007). Il a été établi un premier niveau de classement selon l'origine histopathologique de la tumeur : cellules oligodendrogliales ou astrocytes ou un mélange des deux (oligoastrocytome). Le grade de la tumeur sera défini grâce à l'étude des caractéristiques secondaires d'anaplasie (anaplasie, hyper-cellularité, hyperplasie, polymorphisme cellulaire, atypies nucléaires, activité mitotique atypiques) et associé avec le caractère aggréssif tumoral.



Il est ainsi remarquable de constater que cette augmentation du niveau d'expression de PINK1 est corrélée au stade de la tumeur et à l'agressivité de cette dernière.

<u>Figure 33</u> : Niveau d'expression protéique de PINK1 en fonction du grade tumoral Le niveau protéique de PINK1 est augmenté en corrélation avec le grade de la tumeur.

Les tumeurs établies, sont caractérisées par un niveau autophagique élevé ce qui corrobore nos résultats.

Il faut noter l'existence d'études récentes montrant une participation de PINK1 directement dans la prolifération cellulaire et la promotion tumorale mais également dans l'invasion et la migration des cellules (O'Flanagan et al., 2015). Dernièrement, l'étude de Sameer Agnihotri, relève un effet régulateur négatif de PINK1 sur l'effet Warburg dans les glioblastomes (Agnihotri et al., 2016). Cette étude confirme l'existence d'un impact direct de PINK1 dans les cancers et valide nos perspectives d'étude de la modulation de PINK1 au sein des glioblastomes.

La régulation de la mitophagie par PINK1 peut promouvoir à la fois la mort cellulaire ou la survie. L'augmentation de la mitophagie entrainera la dégradation des mitochondries endommagées prévenant la production de ROS et l'induction de l'apoptose favorisant la survie tumorale. Toutefois, un excès mitophagique contribuera à la mort cellulaire et manifestera une fonction anti-tumorale dans laquelle la parkine participera en tant que suppresseur de tumeur.

Annexes

Article 1:

Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription *Journal of Molecular Cell Biology* (2013), 5, 132–142

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

Article

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

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

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

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

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

[†] These authors contributed equally to this work.

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

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

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

Introduction

Parkin is a pleiotropic protein responsible for most of autosomal recessive juvenile forms of Parkinson's disease (PD) (Dawson and Dawson, 2010; Corti et al., 2011). This protein was first reported to behave as an ubiquitin ligase (Shimura et al., 2000), and therefore, to be involved in proteasomemediated elimination of various substrates. To date, about two dozens of parkin substrates have been identified and it has been postulated that the control of their lifetimes underlies several dysfunctions taking place in PD, since most of parkin-associated mutations abolish its ubiquitin-ligase activity (Shimura et al., 2000). However, besides this canonical function, several studies have indicated that additional parkin-dependent cellular pathways could exist. Thus, we recently documented the fact that parkin could act, in an ubiquitin-ligase independent manner, as a direct transcriptional repressor of the tumor suppressor p53 promoter activity (da Costa et al., 2009).

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

Received March 2, 2012. Revised December 12, 2012. Accepted December 25, 2012. © The Author (2013). Published by Oxford University Press on behalf of *Journal of Molecular Cell Biology*, IBCB, SIBS, CAS. All rights reserved.

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

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

Results

Overexpressed and endogenous parkin control presenilins transcription

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

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

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

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

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

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

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

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

neuroblastoma cells (da Costa et al., 2009). We first confirmed that transient overexpression of wild-type parkin (Figure 4A) upregulates PS1 expression (+42.1% \pm 4.5%, n = 7, P < 0.05, Figure 4B), mRNA levels (+151.9% \pm 8.5%, n = 6, P < 0.001, Figure 4C), and PS1 promoter activity (+112% \pm 28%, n = 8, P < 0.01, Figure 4E), and decreases PS2 expression (+26.1% \pm 7.1%, n = 10, P < 0.05, Figure 4B), mRNA levels (-67.6% + 16.6%, n = 6, P < 0.01, Figure 4D), and promoter activity $(-57.1\% \pm 13.1\%, n = 8, P < 0.01$, Figure 4F). Interestingly, all mutations abolish parkin-associated effects on PS1 and PS2 proteins and mRNA levels and promoter activities (Figure 4A–F). This set of data was reinforced by rescue experiments in which parkin null fibroblasts were transiently transfected with either wild-type or mutated parkin cDNA. As expected, wild-type parkin increases or decreases PS1 or PS2 promoter activity, respectively, while mutant parkin constructs were totally inactive (Figure 4G and H). It is important to note that, in agreement with the above-described data, the same parkin mutations fully abolish caspase-3 activation and p53 repression in transiently **Figure 2** Parkin regulates PS-dependent γ -secretase activity. (**A**–**F**) *In vitro* γ -secretase-mediated production of AB (**A**, **C**, and **E**) and AICD (**B**, **D**, and **F**) by reconstituted membranes prepared from TSM1 neurons stably overexpressing parkin (**A** and **B**), immortalized (**C** and **D**) or primary (**E** and **F**) MEFs invalidated for the *parkin* gene were measured as described in Methods. Each panel contains a representative gel and a histogram in which bars correspond to the means \pm SEM of 3 independent experiments performed in duplicate (**B** and **D**) and triplicate (**A**, **C**, **E**, and **F**). The absence of parkin in immortalized MEFs is illustrated in Figure 1**G** and the lack of parkin in primary MEFs is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 2, panels E, F). The expression of recombinant substrate C100 is shown in Supplementary Figure S3 (see box Figure 2, panels A–F).

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

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

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

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

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

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

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

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

Since parkin-mediated control of PS transactivation was unrelated to its ubiquitin ligase activity and independent of p53, this led us to envision PS1 and PS2 as putative new parkin transcriptional targets. We have delineated the promoter region where parkin could have bound to PS promoters. The deletion of a -297/-11 nucleotide-long fragment in the 5' region of the PS1 promoter abolishes parkin-mediated promoter activation (compare constructs 1 and 2 in Figure 6A), while the removal of the +353/+590 region of PS2 promoter fully abolishes the inhibitory effect of parkin on PS2 promoter transactivation (compare constructs 7 and 8 in Figure 6B). Chromatin immunoprecipitation assays (ChIP) performed with specific primers covering the promoter regions identified above demonstrate the physical interaction of parkin with PS promoters. Thus, the immunoprecipitation of parkin yields specific amplification products with both PS1 and PS2 primers that are drastically enhanced in parkin overexpression conditions (compare IP lanes in Pk and EV conditions in Figure 6C). Of most importance, ChIP analyses indicate that the PCR product of IPed material obtained with PS1 and PS2 primers in wild-type fibroblasts was not amplified in *parkin null* fibroblasts (Figure 6D). Altogether, this indicates that both endogenous and overexpressed parkin physically interact with PS1 and PS2 promoters.

Identification of a parkin consensus binding sequence

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

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

We have previously established that parkin physically interacts with p53 via its RING1 domain (da Costa et al., 2009). We, therefore, assessed the contribution of the RING1-IBR-RING2 domain of parkin that has been suggested as a putative transactivation domain (Morett and Bork, 1999). Interestingly, these domains expressed alone or as multidomain constructs activate PS1 promoter and reduce PS2 promoter transactivation (Supplementary Figure S2A and B). Although these domains were all found active on PS promoters, it should be noted that the most potent constructs encode IBR and RING2 and that the IBR-RING2 construct appeared to be the most potent modulator of both PS1 and **Figure 6** Parkin interacts with the human PS1 and PS2 promoters. (**A** and **B**, upper panels) Representation of the 5' end deletion constructs of the human PS1 (**A**) and PS2 (**B**) promoter regions. (**A** and **B**, lower panels) PS promoter transactivation in HEK293 cells. The indicated PS promoter-luciferase constructs (numbered as in upper panel) were co-transfected with the β -galactosidase reporter gene and either empty vector or wild-type parkin (lanes +) cDNA. The bars represent the means \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. **P* < 0.05, ****P* < 0.001; ns, not statistically significant. (**C**) ChIP analyses of the interaction of parkin with the human PS1 and PS2 promoter in HEK293 cells stably overexpressing either the empty vector (EV) or wild-type parkin (Pk). (**D**) ChIP analyses of the interaction of endogenous parkin with the human PS1 and PS2 promoter in wild-type (Pk+) and *parkin null* (Pk-) fibroblasts. Agarose gels in **C** and **D** represent PCR products obtained with the PCR primers covering the -297/-11 region of the human PS1 promoter or the +353/+590 region of the human PS2 promoter. IP lanes represent immunoprecipitations with specific parkin antibodies (note that Mab5512 specifically immunoprecipitate a band corresponding to parkin in wild-type but not in null fibroblasts, **D**, upper panel); Inp lanes represent the DNA inputs in the indicated cells. Ct lanes represent ChIP with non-correlated antibodies (IgG control). Std lanes represent PCR products of human PS1 and PS2 promoter constructs.

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

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Is parkin-mediated modulation of PS1 potentially important in AD context? It has been documented that parkin-like immunoreactivity co-localizes with AB-related vascular lesions in AD-affected brains (Witte et al., 2009). Furthermore, in sporadic AD, there is little evidence of enhanced production of $A\beta$ but it is rather admitted that $A\beta$ degradation could be impaired at late stages of the disease. Accordingly, parkin can trigger ubiquitinylation and degradation of intracellular AB42 (Burns et al., 2009; Rosen et al., 2010). This could appear paradoxical with respect to our demonstration that parkin upregulates PS1-dependent y-secretase activity. However, it should be kept in mind that AICD, the production of which derives from PS1-dependent γ -secretase activity (Passer et al., 2000; Pardossi-Piquard and Checler, 2011), could contribute to the pathology by enhancing the transcription of GSK3B (Ryan and Pimplikar, 2005), neprilysin (Pardossi-Piquard et al., 2005; 2006; Belyaev et al., 2009), and p53 (Alves da Costa et al., 2006; Ozaki et al., 2006), thereby triggering Tau hyperphosphorylation (Sergeant et al., 2008; Igbal et al., 2010; Medina and Avila, 2010), augmentation of AB42/40 ratio (Kuperstein et al., 2010), and p53-dependent cell death (Kitamura et al., 1997; Garcia-Ospina et al., 2003; Ohyagi, 2008), which are all enhanced in AD pathology. Therefore, it is tempting to speculate that the increase of parkin expression in sporadic AD (Witte et al., 2009) and its mediated enhancement of γ -secretase activity (present study) could potentially contribute, at least in part, to AD neurodegenerative process. One should not, however, rule out the possibility that parkin-mediated enhancement of PS1 activity could influence the processing of many of its documented substrates (De Strooper and Annaert, 2010) that, besides BAPP, could contribute to either AD-related or unrelated functions.

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

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

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

Materials and methods

Promoter activity assays and mapping of parkin functional domain

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

Caspase-3 activity measurements

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

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

In vitro γ -secretase assay

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

Western blot analysis

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

Primary cultured neurons

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

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

Supplementary material

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

Acknowledgments

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

Funding

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

Conflict of interest: none declared.

References

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

Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. Physiol. Rev. *91*, 1161–1218.
Cregan, S.P., Maclaurin, J.G., Craig, C.G., et al. (1999). Bax-dependent

caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. J. Neurosci. *19*, 7860–7869.

- da Costa, C.A., and Checler, F. (2010). A novel parkin-mediated transcriptional function links p53 to familial Parkinson's disease. Cell Cycle 9, 16–17.
- da Costa, C.A., Sunyach, C., Giaime, E., et al. (2009). Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. Nat. Cell Biol. *11*, 1370–1375.
- Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2010). The role of parkin in familial and sporadic Parkinson's disease. Mov. Disord. 25(Suppl 1), S32–S39.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2010). Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 26, 235–260.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., et al. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. Nature 391, 387–390.
- Dunys, J., Sevalle, J., Giaime, E., et al. (2009). p53-dependent control of transactivation of the Pen2 promoter by presenilins. J. Cell Sci. 122, 4003–4008.
- Fallon, L., Belanger, C.M., Corera, A.T., et al. (2006). A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. Nat. Cell Biol. *8*, 834–842.
- Garcia-Ospina, G.P., Ginenez-del Rio, M., Lopera, F., et al. (2003). Neuronal DNA damage correlates with a positive detection of c-Jun, nuclear factor κ B, p53 and Par-4 transcription factors in Alzheimer's disease. Rev. Neurol. *36*, 1004–1010.
- Goldberg, M.S., Fleming, S.M., Palacino, J.J., et al. (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. J. Biol. Chem. *278*, 43628–43635.
- Hwang, S., Kim, D., Choi, G., et al. (2010). Parkin suppresses c-Jun N-terminal kinase-induced cell death via transcriptional regulation in Drosophila. Mol. Cells 29, 575–580.
- lqbal, K., Liu, F., Gong, C.X., et al. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. Curr. Alzheimer Res. 7, 656–664.
- Jiang, H., Jiang, Q., Liu, W., et al. (2006). Parkin suppresses the expression of monoamine oxidases. J. Biol. Chem. *281*, 8591–8599.
- Joch, M., Ase, A.R., Chen, C.X., et al. (2007). Parkin-mediated monoubiquitination of the PDZ protein PICK1 regulates the activity of acid-sensing ion channels. Mol. Biol. Cell 18, 3105–3118.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M., et al. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}. Cell 91, 649–659.
- Kang, D.E., Yoon, I.S., Repetto, E., et al. (2005). Presenilins mediate PI3K/AKT and ERK activation via select signaling receptors: selectivity of PS2 in PDGF signaling. J. Biol. Chem. 280, 31537–31547.
- Kitamura, Y., Shimohama, S., Kamoshima, W., et al. (1997). Changes of p53 in the brains patients with Alzheimer disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 232, 418–421.
- Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., et al. (2010). Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. EMBO J. 29, 3408–3420.
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., et al. (2006). Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum. Mol. Genet. *15*, 883–895.
- Lee, S., and Das, H.K. (2010). Transcriptional regulation of the presenilin-1 gene controls gamma-secretase activity. Front. Biosci. (Elite Ed) 2, 22–35.
- Liu, M., Aneja, R., Sun, X., et al. (2008). Parkin regulates Eg5 expression by Hsp70 ubiquitination-dependent inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase. J. Biol. Chem. 283, 35783–35788.
- Medina, M., and Avila, J. (2010). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. Curr. Pharm. Des. *16*, 2790–2798.
- Mitsuda, N., Roses, A.D., and Vitek, M.P. (1997). Transcriptional regulation of the mouse presenilin-1 gene. J. Biol. Chem. 272, 23489–23497.

- Morett, E., and Bork, P. (1999). A novel transactivation domain in parkin. Trends in Biochem. Sci. 24, 229–231.
- Ohyagi, Y. (2008). Intracellular amyloid beta-protein as a therapeutic target for treating Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. *5*, 555–561.
- Ounallah-Saad, H., Beeri, R., Goshen, I., et al. (2009). Transcriptional regulation of the murine presenilin-2 gene reveals similarities and differences to its human orthologue. Gene 4456, 81–89.
- Ozaki, T., Li, Y., Kikuchi, H., et al. (2006). The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *351*, 57–63.
- Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2011). The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. J. Neurochem. 120(Suppl 1), 109–124.
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. Neuron *46*, 541–554.
- Pardossi-Piquard, R., Dunys, J., Yu, G., et al. (2006). Neprilysin activity and expression are controlled by nicastrin. J. Neurochem. 97, 1052–1056.
- Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., et al. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by γ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid β protein precursor. J. Alzheimers Dis. 2, 289–301.
- Pastorcic, M., and Das, H.K. (2000). Regulation of transcription of the human presenilin-1 gene by Ets transcription factor and the p53 protooncogene. J. Biol. Chem. *275*, 34938–34945.
- Rinn, J.L., and Huarte, M. (2011). To repress or not to repress: this is the guardian's question. Trends Cell Biol. *21*, 344–353.
- Roperch, J.-P., Alvaro, V., Prieur, S., et al. (1998). Inhibition of presenilin1 expression is promoted by p53 and p21^{WAF-1} and results in apoptosis and tumor suppression. Nat. Med. 4, 835–838.
- Rosen, K.M., Moussa, C.E., Lee, H.K., et al. (2010). Parkin reverses intracellular beta-amyloid accumulation and its negative effects on proteasome function. J. Neurosci. Res. *88*, 167–178.
- Ryan, K.A., and Pimplikar, S.W. (2005). Activation of GSK3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain. J. Cell Biol. *171*, 327–335.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., et al. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. Expert Rev. Proteomics *5*, 207–224.
- Sevalle, J., Amoyel, A., Robert, P., et al. (2009). Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. J. Neurochem. *109*, 248–256.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., et al. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat. Genet. *25*, 302–305.
- Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., et al. (2003). The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. Nature 422, 438–441.
- Unschuld, P.G., Dachsel, J., Darios, F., et al. (2006). Parkin modulates gene expression in control and ceramide-treated PC12 cells. Mol. Biol. Rep. *33*, 13–32.
- Vincent, B., Beaudet, A., Dauch, P., et al. (1996). Distinct properties of neuronal and astrocytic endopeptidase 3.4.24.16: a study on differenciation, subcellular distribution and secretion processes. J. Neurosci. 16, 5049–5059.
- Witte, M.E., Bol, J.G., Gerritsen, W.H., et al. (2009). Parkinson's diseaseassociated parkin colocalizes with Alzheimer's disease and multiple sclerosis brain lesions. Neurobiol. Dis. 36, 445–452.
- Wolfe, M.S. (2001). Secretase targets for Alzheimer's disease: identification and therapeutic potential. J. Med. Chem. 44, 2039–2060.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., et al. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. Nature *398*, 513–517.

Supplementary Methods

Cells and transfections

Telencephalon specific mouse 1 (TSM1), MEF, human embryonic kidney 293 (HEK293) and SH-SY5Y human neuroblastoma cells were cultured in 5% CO₂, in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum containing penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml). Stable transfection of TSM1 neurons expressing empty vector or wild-type HA-tagged parkin was carried out as described¹. Immortalized MEF invalidated for the *presenilins*, *parkin*, *p53* and *p53/p19*^{arf} genes have been graciously given by Drs B. de Strooper, T. Dawson, and M. Roussel, respectively. Transient transfection of SH-SY5Y and HEK293 were carried by means of either lipofectamine 2000 (Invitrogen) or jet PRIME (Polyplus-transfection) reagent according to the manufacturer's instructions while parkin, p19^{Arf-1-/-}, p19^{Arf-1-/-}p53^{-/-} fibroblasts² were transfected by means of NucleofactorTM kit (Amaxa Biosystems) as previously described³.

Constructs and mutagenesis

The cDNA of human parkin has been PCR-amplified using the hPark2wt forward and reverse primers (see Supplementary Table S1) and cloned between the *Nhe*I and *BgI*II site in the pIRES2-EGFP-NEO vector (Clontech). A site-directed mutagenesis kit (QuickChange II, Stratagene) was used according to the manufacturer's instructions to convert the wild-type cDNA of parkin into the distinct mutated forms of parkin responsible for genetic PD. The full length and the 5'end deletion of hPS2 promoter-luciferase constructs have been described previously⁴. Based on the previously described and available hPS1 full-length promoter-luciferase construct⁵, we have obtained four 5'end-truncated promoter-luciferase constructs according to the following strategy. The full length hPS1 promoter-luciferase construct was used as a template in a PCR reaction to amplify, with primers described in Supplementary Table S1, promoter fragments of 308, 624, 967 and 1269 nucleotides. These fragments were digested with *Nhe*I and *Hin*DIII then subcloned in the pGL3 basic vector (Promega). Deletion of the putative parkin binding site of human p53, PS1 and PS2 promoters have been made using the Stratagene site-directed mutagenesis kit, according to the

manufacturer's instructions. The C100-Flag-PET29c construct has already been described⁶. All the constructs were verified by sequencing. All the primers are shown in Supplementary Table S1.

Real-time PCR

Total RNA from cells and mouse brains was respectively extracted using the Nucleospin RNA II kit and RNeasy Lipid Tissue kit following the instructions of manufacturer (Macherey-Nagel GmbH & Co. and Qiagen). After treatment with DNase I, total RNA (2 μ g) were reversetranscribed with AMV-transcriptase (Promega) using oligo-dT priming. Real-time PCR were performed in the Light Cycler 480 (Roche) or Rotor-Gene6000 (Qiagen), using the SYBR Green detection protocol recommended by the manufacturer. Specific-gene primers were designed by means of the Universal Probe Library Assay Design Center software (Roche Applied Science). Relative expression levels of mouse and human *PS1* and *PS2* genes were normalized for RNA concentrations with mouse γ -actin and human GAPDH genes. All the primers are described in Supplementary Table S2.

EMSA

EMSA was performed by means of a commercial gel shift chemiluminescent kit provided by Actif Motif. In brief, purified wild-type and mutated recombinant (200 ng) parkin obtained as described in ⁷ were incubated in binding buffer (20% glycerol, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) at 21°C for 20 min with 20 fmol of distinct double stranded 5'biotin end-labeled oligonucleotides (Eurogentec, Supplementary Table S3) bearing or not the putative parkin consensus motif. Complexes are then resolved by eletroctrophoresis on a 6% native polyacrylamide gel at 4°C, transferred to a positively charged nylon membrane (Thermo Scientific), cross-linked (UV-light cross-linker equipped with a 254 nm bulb) and revealed by means of streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (HRP) and a chemiluminescent substrate. When indicated a 5 min pre-incubation with an excess (4 pmol) of unlabeled specific and non-related control DNA before adding the biotin-labeled probes was performed to confirm specific DNA-protein interaction.

2

ChIP

ChIP assay was performed according to ChIP-IT[™] kit's instructions (Active Motif). Briefly, to prepare chromatin from either HEK293 (mock-transfected or stably overexpressing parkin) or MEFs (control and parkin null) cells were seeded in three 150 mm dishes and allowed to reach 70%-80% confluence. Cells were fixed with formaldehyde and processed for chromatin preparation according to the manufacturer's recommendations. DNA obtained was digested with the shearing enzyme provided in the kit as recommended by the supplier, yielding chromatin fragments of about 200-500 bp in size. Each immunoprecipitation was performed on 50 µl of chromatin in the ChIP immunoprecipitation buffer supplied, with 2 ug of anti-parkin primary antibody (MAB5512, Chemicon International, Inc., characterized in ⁸) or irrelevant antibodies (IgG) as negative controls. Immune complexes were incubated (1.5 h, 4°C) with 100 µl of a solution of protein G-Sepharose. After elution of the immune complexes, cross-links were reversed and RNA digested using RNase (100 µg/ml). To eliminate proteins, proteinase K (100 ug/ml) was added and the samples were incubated for 2 h at 42°C. DNA was purified on columns and PCR amplifications were performed using specific primers for the -297/+18 bp region of the human PS1 promoter (forward: 5'-GGT-ACC-CTA-AAG-AAA-TGA-CAG-GTG-TTA-AAT-TTA-GGA-TGG-CC-3'; reverse: 5'-CCG-AGA-ACC-CTC-ACC-GTT-GTC-GTC-3'), specific primers for the +423/+632 bp region of the human PS2 promoter (forward: 5'-GCG-CGA-GCG-GTT-AAA-GGG-CC -3'; reverse 5'-GCC-CTG-CCC-CTC-ACG-TGC-3'), specific primers for the -556/-358 bp region of the mouse PS1 promoter (if +1 corresponds to the transcription start of PS1, forward: 5'-CCT-AGA-GAG-GCC-TCA-GGT-CGC-G-3'; reverse: 5'-CAC-GGA-GCA-GGT-CGT-CCT-AGG-CC-3') and specific primers for the +86/+384 bp region of the mouse PS2 promoter (if we use as +1 the transcription start site of the transcript variant 2) (forward: 5'-GAG-GGC-GGG-GGC-TGG-GTG-TG-3'; reverse: 5'-CAC-CCG-GAC-GCG-GCC-AGA-GG-3').

3

Name	Sequence	Comments		
hPark2wt forward	5'- CTA GCT AGC CAC CAT GAT AGT GTT TGT CAG G -3'	contain a Nhel site and a Kosak sequence		
hPark2wt reverse	5'- GAA GAT CTC TAC ACG TCG AAC CAG TGG -3'	contain a stop codon and a BgIII site		
hPark2K161N forward	5'- GAG TGC AGC CGG GAA A(T)C TCA GGG TAC AGT GC -3'	domain SH2-like ⁹ .		
hPark2K161N reverse	5'- GCA CTG TAC CCT GAG (A)TT TCC CGG CTG CAC TC -3'			
hPark2R256C forward	5'-CCA GTG CAA CTC C(T)G CCA CGT GAT TTG C-3'	domain R1 ⁹ .		
hPark2R256C reverse	5'-GCA AAT CAC GTG GC(A) GGA GTT GCA CTG G-3'			
hPark2C418R forward	5'- CCA CCA AGC CC(C) GTC CCC GCT GCC ATG -3'	domain R2 ¹⁰ .		
hPark2C418R reverse	5'- CAT GGC AGC GGG GAC (G)GG GCT TGG TGG -3'			
hPark2C441R forward	5'- CCG CAG CCC CAG (C)GC AGG CTC GAG TGG -3'	domain R2 ¹¹ .		
hPark2C441R reverse	5'- CCA CTC GAG CCT GC(G) CTG GGG CTG CGG -3'			
hp.PS1fgt5 forward	5'- CTAGCTAGCGAC CTG GTT TAG AGA GGA GGG -3'	(308 nucleotides) contain an Nhel site		
hp.PS1fgt4 forward	5'- CTAGCTAGCGCAT GCA TGT CCA GTG ACT C -3'	(624 nucleotides) contain an Nhel site		
hp.PS1fgt3 forward	5'- CTA GCT AGC GTG TGG GAA ACC AGG AGG -3'	(967 nucleotides) contain an Nhel site	(967 nucleotides) contain an Nhel site	
hp.PS1fgt2 forward	5'- CTAGCTAGCGAA ATG ACG ACA ACG GTG AGG -3'	(1269 nucleotides) contain an Nhel site	(1269 nucleotides) contain an Nhel site	
hp.PS1 reverse	5'- CCC AAG CTT CCC TCC CCT TCC -3'	contain an HinDIII site		
hp.p53∆PK forward	5'-CCC CAA CTC CAT TTC CTT TGC (-) AGG CGG ATT ACT TGC CCT TAC-3'	deletion of (-252/-243) 5'-TTC <u>CTCCGGC</u> -3' 3'-AAG <u>GAGGCCG</u> -5'		
hp.p53∆PK reverse	5'-GTA AGG GCA AGT AAT CCG CCT (-) GCA AAG GAA ATG GAG TTG GGG-3'			
hp.PS1∆PK forward	5'- CGC AAT CGT TTC TCC AG (-) C CCC GCC CCC TTC C-3'	deletion of (-83/-76) 5'- <u>GCCGGAG</u> -3'		
hp.PS1ΔPK reverse	5'- GGA AGG GGG CGG GG (-) C TGG AGA AAC GAT TGC G-3'	3'- <u>CGGCCTC</u> -5'	-5'	
hp.PS2∆PK forward	5'- GGG CGT TTT GTT CTT CTC TCT C (-) AC CTC CGT TGC GCC G -3'	deletion of (+521/+527) 5'- <u>GCCGGAG</u> -3' 3'- <u>CGGCCTC</u> -5'		
hp.PS2∆PK reverse	5'- CGG CGC AAC GGA GGT (-) GAG AGA GAA GAA GAA CAA AAC GCC C -3'			

Supplemental Table 1 Primers used to make the constructs and to perform the mutagenesis.

The studies describing the mutations of *parkin* are listed in the supplemental references. For *parkin* mutations, the nucleotide that is mutated is into parenthesis for each mutagenesis primer used. In the primers used for deletion of the parkin putative binding site (underlined) on p53, PS1, and PS2 promoters the location of the nucleotides deleted is indicated by parenthesis (-). In the column "Comments" the positions of the nucleotides deleted in the human *p53*, *PS1* and *PS2* promoters refer at the (+1) of the transcriptional start site.

Name	Sequences of forward primers	Sequences of reverse primers	Species
hPS1	5'-TGC ACC GTT GTC CTA CTT CCA-3'	5'-TGT GCT CCT GCC GTT CTC TAT-3'	human
mPS1	5'-AGC CAT ACT GAT CGG CCT GT-3'	5'-TTG AAA ATG GCG AGC AGG AG-3'	mouse
hPS2	5'-TCA TGC TGT TTG TGC TCA-3'	5'-TGT CCT CAG TGA ATG GCG TGT-3'	human
mPS2	5'-ATG TGG CCA TGG ACT ATC CC-3'	5'-CCC CGA AGT TCC AGA CAG C-3'	mouse
hGAPDH	5'-TGG GCT ACA CTG AGC ACC AG-3'	5'-CAG CGT CAA AGG TGG AGG AG-3'	human
m γ-ACTIN	5'-CAC CAT CGG TTG TTA GTT GCC-3'	5'-CAG GTG TCG ATG CAA ACG TT-3'	mouse

Supplemental Table 2 Primers used for quantitative PCR.

Name	Sequence	Comments	
Gel Shift hp53 forward	5'- CCA TTT CCT TTG CTT CCT CCG GCA GGC GGA TTA CTT GCC C-3'	gel shift primers for h p53	
Gel Shift hp53 reverse	5'- GGG CAA GTA ATC CGC CTG CCG GAG GAA GCA AAG GAA ATG G-3'		
Gel Shift hp53∆PK forward	5'- CCA TTT CCT TTG CTT CAG GCG GAT TAC TTG CCC-3'	gel shift primers IPK for h p53	
Gel Shift hp53∆PK reverse	5'- GGG CAA GTA ATC CGC CTG AAG CAA AGG AAAT GG-3'		
Gel Shift hPS1 forward	5'- CGC AAT CGT TTC TCC AGG CCG GAG GCC CCG CCC CCT TCC T-3'	gel shift primers for h PS1	
Gel Shift hPS1 reverse	5'- AGG AAG GGG GCG GGG CCT CCG GCC TGG AGA AAC GATT GCG-3'	_	
Gel Shift hPS1ΔPK forward	5'- CGC AAT CGT TTC TCC AGG CCC CGC CCC CTT CCT-3'	gel shift primers IPK for h PS1	
Gel Shift hPS1ΔPK reverse	5'-AGG AAG GGG GCG GGG CCT GGA GAA ACG ATT GCG-3'	_	
Gel Shift hPS2 forward	5'-TTG TTC TTC TTC TCT CTC GCC GGA GAC CTC CGT TGC GCC G-3'	gel shift primers for h PS2	
Gel Shift hPS2 reverse	5'- CGG CGC AAC GGA GGT CTC CGG CGA GAG AGA AGA AGA ACA A-3'	_	
Gel Shift hPS2ΔPK forward	5'- TTG TTC TTC TTC TCT CTC ACC TCC GTT GCG CCG-3'	gel shift primers IPK for h PS2	
Gel Shift hPS2∆PK reverse	5'- CGG CGC AAC GGA GGT GAG AGA GAA GAA GAA CAA-3'		

Supplemental Table 3 Primers used in the gel shift experiments. The oligonucleotides, containing or not the putative parkin consensus motif are 5'biotin end-labeled. Not that a set of the same primers, containing the putative parkin consensus motif, but not biotinylated have also been used in the gel shift competition experiments described in figure 7 panels E to G.

Supplemental references

1. Alves da Costa, C., Ancolio, K., and Checler, F. (2000). Wild-type but not Parkinson's disease-related Ala53Thr- α -synuclein protect neuronal cells from apoptotic stimuli. J. Biol. Chem. 275, 24065-24069.

2. Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M., et al. (1997). Tumor suppression at the mouse *INK4a* locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}. Cell *91*, 649-659.

3. Sunyach, C., Cisse, M.A., da Costa, C.A., et al. (2007). The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation. J. Biol. Chem. 282, 1956-1963.

4. Ounallah-Saad, H., Beeri, R., Goshen, I., et al. (2009). Transcriptional regulation of the murine Presenilin-2 gene reveals similarities and differences to its human orthologue. Gene 446, 81-89.

5. Mitsuda, N., Roses, A.D., and Vitek, M.P. (1997). Transcriptional regulation of the mouse presenilin-1 gene. J. Biol. Chem. 272, 23489-23497.

6. Sevalle, J., Amoyel, A., Robert, P., et al. (2009). Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. J. Neurochem. *109*, 248-256.

7. Hampe, C., Ardila-Osorio, H., Fournier, M., et al. (2006). Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. Hum. Mol. Genet. *15*, 2059-2075.

8. Pawlyk, A.C., Giasson, B.I., Sampathu, D.M., et al. (2003). Novel monoclonal antibodies demonstrate biochemical variation of brain parkin with age. J. Biol. Chem. 278, 48120-48128.

9. Abbas, N. *et al.* A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet* **8**, 567-574 (1999).

10. Bertoli-Avella, A.M. et al. Novel parkin mutations detected in patients with early-onset Parkinson's disease. Mov Disord (2004).

11. West, A. et al. Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease. Am J Med Genet 114, 584-591 (2002).

Supplementary Figures

Supplementary Figure S1. Parkin controls presenilins expression, promoter activity and mRNA levels in primary cultured neurons. (A-F) Primary cultured neurons were transiently transfected with pcDNA3 (EV) or human parkin cDNA (Pk) then PS1 and PS2 expression (A and D), promoter activity (B and E) and mRNA levels (C and F) were analyzed as described in the Methods. Bars represent the means \pm SEM of 3-4 independent experiments performed in duplicates and are expressed as percent of control EV-transfected cells. Actin levels determination was used as protein and mRNA loading control, while β -galactosidase measurement was used to normalize luciferase-based promoter assays as described in Methods. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.



Duplan et al. Supplementary Figure S1

Supplementary Figure S2. Mapping of the parkin domain involved in PS transcription regulation. Full length HA-parkin (Pk) and the deleted HA-parkin constructs corresponding to its Ring1 (R1), Ring2 (R2), Ring1-IBR (R1-IBR) and Ring2-IBR (R2-IBR) were co-transfected (see expressions of fragments in A) with either the PS1 promoter (B) or PS2 promoter (C) and β -galactosidase constructs (to normalize transfection efficiency) in SH-SY5Y neuroblastoma cells as described in Methods. Values are expressed as percent of EV-transfected cells (controls taken as 100) and are the means \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicates. *p<0.05; **p<0.01 and ns, not statistically significant.



Duplan et al. Supplementary Figure S2
Supplementary Figure S3. Recombinant and overexpressed proteins expressions. (box Fig.2): upper, western blot analysis of parkin in wild-type and null primary MEF cells used in panels Fig.2E and 2F; lower, detection of recombinant C100 protein either by western blot (left) or Coomassie blue coloration (right) used in panels Fig.2A-F. (box Fig.3): upper, analysis of PS1 and PS2 expression in stable HEK293 cells used in Fig.3C and 3E; middle, analysis of PS1 and PS2 expression in MEF cells used in Fig.3D; lower, evaluation of HAtagged wild-type parkin transient expression in HEK293 cells stably overexpressing PS1/PS2 associated to Fig.3E. (box Fig.5): upper, western blot analysis of p53 in MEF cells control or invalidated for the *p53* gene used in Fig.5A-D; middle, evaluation of wild-type parkin transient expression in MEF cells control or invalidated for the p53 gene regarding PS1(1)/PS2(2) promoter experiments associated to Fig.5A and 5C; lower, evaluation of wild-type parkin transient expression in MEF cells control or invalidated for the p53 gene regarding PS1(1)/PS2(2) mRNA experiments associated to Fig.5B and 5D. (box Fig.7): left, evaluation of wild-type parkin (Pk) transient expression in SH-SY5Y cells used in Fig.7B-D; right, western blot detection of recombinant wild-type (Wt) and mutated (161 and 441) parkin protein used in Fig.7E-I.



Duplan et al. Supplementary Figure S3

Article 2:

ORIGINAL ARTICLE

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

Oncogene (2014) 33, 1764–1775

J Viotti, E Duplan, C Caillava, J Condat, **T Goiran**, C Giordano, Y Marie2, A Idbaih, J-Y Delattre2, J Honnorat, F Checler and C Alves da Costa

www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

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

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

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

Oncogene (2014) 33, 1764-1775; doi:10.1038/onc.2013.124; published online 6 May 2013

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

Received 18 July 2012; revised 13 February 2013; accepted 18 February 2013; published online 6 May 2013

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

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

RESULTS

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

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

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



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

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

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

1766



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

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

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

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

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

Parkin and p53 interplay in glioma development J Viotti *et al*

1767



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

To definitely confirm this conclusion, we assessed the ability of wild-type and mutated p53 to modulate parkin expression and promoter transactivation. SH-SY5Y were transiently transfected with empty vector or p53 complementary DNA (cDNA) constructs either wild-type or harboring the R175H or the R273H mutation. It should be noted that the R273H mutation is the one occurring in the 8-MG glioblastoma cell line studied in Figure 5.³¹ Figure 3 indicates that both parkin protein levels (Figure 5g) and promoter transactivation (Figure 5h) were increased by the overexpression of wild-type p53 cDNA while p53 mutations fully abolished p53associated increases of parkin protein and promoter transactivation. Finally, we have taken advantage of a cell model, in which an inactive dominant-negative p53 is overexpressed (MCF7-DD p53, see Materials and methods) to further confirm that the transcriptional inactivation of p53 leads to a diminution of parkin expression (-44.8 ± 15.8 , n = 4, P < 0.05, Figure 5i). The above set of data shows that one of the physiological roles of p53 is likely to transcriptionally upregulate parkin protein and suggests that TP53 mutations abolish this function, thereby leading to a cellular deficit of parkin.

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

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

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

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

Parkin and p53 interplay in glioma development J Viotti *et al*

npg 1768

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

Grade	Cell type	ID	PARK2 mutations				p53 mutations						
			SNP	Location	Codon	Change	a.a change	Mutation	SNP	Location	Codon	Change	a.a change
II													
	Oligodendroglioma	1237	No	_	_	_	_	No Yes	Yes No	Exon4 Exon4	72 90	CGC en CCC TCC en TTC	Pro en Arg Ser en Phe
		1309	No	_	_	_	_	No	No	EXONS	_		Arg en His
		1487 1507	No No	_	_	_	_	No No	No Yes	Exon4	— 72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1547	No	_	_	_	_	No No	Yes No	Exon6	213	CGA in CGC	Arg in Arg
		1790	No	—	—	—	—	No	No	—	—	_	—
		2001	No Yes	Exon3	134	 Ins	Ins Pro	No No	No Yes	Exon4	 72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2018	No	_	_	CCA	_	No	Voc	Exon4	72		Pro in Arg
		2018	NO	_	—	_	_	Yes	No No	Exon5 Exon7	131 238	AAC in AGC TGT in TTT	Asn in Ser Cys in Phe
	wixed glioma	0665	No	_	_	_	_	No	No	_	_	_	_
		1200	Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1236 1286	No No	_	_	_	_	No No	Yes Yes	Exon4 Exon4	72 72	CGC in CCC	Pro in Arg Pro in Arg
		1507	N.	5 10	200	CTA :	1411	No	Yes	Exon7	233	CAC in CAT	His in His
		1527	Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	Yes	No	Exon8	280	AGA IN GGA	Arg in Gly
		1050	res	EXONITI	394	AAT	Aspin	NO	NO			_	
		1714 1967	No No	_	_	_	_	Yes Yes	No No	Exon5 Exon6	154 213	GGC in GTC CGA in TGA	Gly in Val Arg in STOP
	Astrocytoma	1171	Yes	Exon3	174	CTC in CTT	Leu in Leu	Yes	No	Exon8	273	CGT in TGT	Arg in Cys
111													
	Oligodendroglioma	1054	No	_	_	_	_	No	No	_	_	_	_
		1727	No	—	—	—	—	No	No	 Evon4			Bro in Arg
		1998	No	_	_	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2137	No	—	—	—	—	No Yes	Yes No	Exon4	72 262	CGC in CCC	Pro in Arg Gly in Val
		2148	Yes	Exon10	380	GTA in	Val in	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
						CIA	LCu	Yes Yes	No No	Exon8 Exon8	267 273	CGG in TGG CGT in TGT	Arg in Trp Arg in Cys
	Mixed glioma	0666	No	_	_	_	_	No	No	_	_	_	_
		1231	No	—	—	—	—	Yes	No	Exon6	220	TAT in TGT	Tyr in Cys
		1241	No	_	—	_	_	Yes	No	Exon7	234	TAC in TGC	Tyr in Cys
								No Yes	Yes No	Exon4 Exon2	72 15	CGC in CCC AGT in TGT	Pro in Arg Ser in Cvs
		1324	Yes	Exon10	380	GTA in	Val in	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
						CIA	Leu	Yes	No	Exon5	138	GCC in GTC	Ala in Val
		1381	Yes	Exon10	380	GTA in	Val in	Yes Yes	No No	Exon7 Exon7	245 248	GGC in TGC CGG in CAG	Gly in Cys Arg in Gln
		1384	Yes	Exon10	380	CTA GTA in	Leu Val in	No	No	_	—	_	_
		1522	No	_	_	_		No	No	_	_	_	_
		1818 1825	No Yes	 Exon6	 261	 TTA in	 Leu in	No No	No Yes	Exon4	 72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2037	No	_	_	TTG	Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Ara
		2037	No.	F	204	CAT		No	Yes	Intron8		Exon9–2A > C	
		2072	res	Exon11	394	GAT IN AAT	Asp in Asn	NO	res	Exon4	12		Pro in Arg
								No Yes	Yes No	Exon6 E xon10	213 341	CGA in CGG TTC in GAATC	Arg in Arg Reading
		2141	Yes	Exon10	380	GTA in	Val in	No	Yes	Exon4	72	(delTinsGAA) CGC in CCC	frame shift Pro in Arg
		2202	Yac	Exon10	380	GTA in	Val in	Yes	No Yos	Exon6	193	CAT in TAT	His in Tyr Pro in Arc
		2203	162	LAUITU	200	CTA	Leu	NU N	103	Ex0114	12		
	Astrocytoma	1729	No	_	_	_	_	res Yes	No No	Exon5 Exon7	244	GGC in GAC	Gly in Asp



Grade	Cell type	ID	PARK2 mutations				p53 mutations						
			SNP	Location	Codon	Change	a.a change	Mutation	SNP	Location	Codon	Change	a.a change
IV													
	Mixed glioma												
		1428	No	—	_	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1/32	NO Vee	 Even 10				NO	NO Vee				 Due in Au
		1960	res	EXONIO	200			INO	res	EX0114	12		PIO IN AIQ
						CIA	Leu	Vec	No	Exon5	161	GCC in ACC	Ala in Th
		2026	No	_	_	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arc
		2020						Yes	No	Exon7	248	CGG in TGG	Arg in Tri
		2068	No	_	_	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arc
		2140	No	_	_	_	_	No	No		_	_	
	Glioblastoma												
		0060	No	_	_	_	_	No	No	_	_	_	_
		1491	No	—	_	—	—	No	No	_	_	—	_
		1543	No	—	—	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1688	No	—	—	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		1999	No	—	—	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2050	No	_	—	_	_	Yes	No	Exon7	235	AAC in GAC	Asn in As
		2055	Yes	Exon10	380	GTA in CTA	Val in Leu	No	Yes	Exon4	36	CCG in CCA	Pro in Pro
								No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
		2112	Yes	Exon6	261	TTA in TTG	Leu in Leu	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arc
								Yes	No	Exon6	193	CAT in TAT	His in Ty
		2134	No	—	_	_	_	No	Yes	Exon4	72	CGC in CCC	Pro in Arg
								Yes	No	Exon8	273	CGT in CAT	Arg in Hi
		2202	yes	Exon11	394	GAT in AAT	Asp in Asn	Yes	No	Exon7	248	CGG in CAG	Arg in Gl

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

Table 2. Frequency of p53 mutations in human brain tumor biopsies										
Cell type		Tumor grade								
	11	<i>III</i>	IV							
Mixed glioma Oligodendrogliomas	38% 22%	54% 33%								
Glioblastoma		_	36%							

p53 controls parkin transcription via its DNA binding properties The above data concerning the loss of function of p53 transcriptional activity is supported by the levels of the well-established p53 transcriptional targets Bax in glioblastomas (see Figure 2). The fact that parkin promoter transactivation was also impaired by p53 mutations led us to envision that parkin could behave as a direct transcriptional target of p53. This hypothesis is supported by the fact that the two mutations shown to abolish p53-associated increase of parkin protein and mRNA (see data in Figures 5f-h) have been described as hot spot p53 glioma-associated mutations that are known to abolish p53 DNA binding properties (for review see Brosh and Rotter³⁶). On the basis of this assumption, we have performed an in silico study of the human parkin promoter and we have identified a probable p53 consensus motif (Figure 9a). We have deleted part of this sequence from the parkin promoter (Figure 9a) and analyzed the impact of p53 overexpression on wild-type (Wt-hPK) or p53-deleted (Δ -hPK) parkin promoter activities. As would have been predicted, the overexpression of wild-type p53 leads to an upregulation of the wild-type parkin promoter activity ($+640.2 \pm 34.5$, P < 0.0001, Figure 9b), a feature fully abrogated by the deletion of the p53-responsive element (Δ -hPK, Figure 9b). Altogether, these data definitely demonstrates that p53 controls parkin transcription via its interaction with parkin promoter. This agrees well with a recent study by Zhang *et al.*³⁷ that shows that p53 physically interacts with parkin promoter by ChIP analysis.

DISCUSSION

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

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

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

1770



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



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

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

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

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

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

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

Parkin and p53 interplay in glioma development J Viotti *et al*

1771



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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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



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

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

Constructs

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



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

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

Patient samples

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

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



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

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

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



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

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

Western blot analyses

Proteins (50 µg for biopsies and cell homogenate samples and 100 µg for mice brain samples) were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels and wet-transferred to Hybond-C (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) membranes. Then, samples were immunoblotted using mouse monoclonal anti-parkin (MAB5512, Chemicon, Billerica, MA, USA), anti-flag (Sigma, Lyon, France) and anti-Bcl2 (SC7382, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) antibodies or with rabbit polyclonal antip53, (CM1 provided by JC Bourdon) and anti-bax (6A7, Pharmingen,



Figure 10. Parkin and p53 interplay in physiological and cancerlinked pathological contexts. In normal conditions, that is, when both parkin and p53 are wild-type proteins, several cellular challenges such as stress leads to transient increased levels of p53 allowing the protein to trigger its stress-related phenotypes. Concomitantly, this increase in wild-type p53 leads to increased levels of parkin (Zhang *et al.*³⁷ and present study). As a consequence, increased parkin triggers transcriptional repression of p53,¹⁷ allowing restoring p53 normal levels. Thus, parkin and p53 interplay contributes to the regulation of parkin/p53 homeostasis in normal conditions. In cancer-related conditions linked to p53 mutations, the abolishment of p53 transcriptional activity leads to a drastic reduction of parkin. These lower levels of parkin trigger enhanced expression of mutated inactive p53. This may explain the inverse correlation existing between the expression levels of parkin and p53 in glioma tumors.



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

1774

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

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

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

Stereotaxy and viral injection

Adult females C57BI/6 (P90) were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg body weight; Ketamine 1000; Ceva, Bruxelles, Belgique) and xylazine (10 mg/kg body weight; Rompun 2%; Centravet, Plancoet, France) dissolved in 0.9% sterile saline and positioned in a stereotaxic frame. Animals of each group (control and wild-type p53) were injected bilaterally into the striatum, using appropriate coordinates (1 mm anterior to the bregma, 2 mm lateral and 3 mm deep from the skull surface) with either eGFP adenovirus or adenovirus expressing human p53 and GFP (10⁷ PFU in each hemisphere; Vector Biolabs, Philadelphia, PA, USA). Animals were killed 3, 7 and 14 days after injection. Proteins and mRNA were extracted from whole brains and analyzed as described above.

p53 activity and parkin promoter transactivation

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

1 Mb genomic bacterial artificial chromosome ARRAY-CGH

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

Mutation analysis of PARK2 and TP53

All *PARK2 and TP53* coding exons of all tumor and paired-blood plasma DNAs were analyzed by Universal tailed amplicon sequencing approach (454 Sequencing Technology, Roche) and confirmed by direct genomic sequencing of both DNA strands by Sanger's method. In brief, the Universal tailed amplicon sequencing with 454 GS Junior system implies a initial PCR amplification (using primers detailed in Supplementary Table S1 and amplification conditions available upon request) of high-molecular weight DNA extracted using standard phenol-chloroform procedures, a second PCR aiming MID (multiplex identifier) and 454 adapters incorporation, an emulsion PCR step launched according to the emPCR Amplification Method Manual Lib-A protocol (GS Junior Titanium Series, Roche) and enrichment and pyrosequencing according to the Sequencing Method Manual (Roche). Mutations found with GS Junior were validated by Sanger sequencing method. To make sure of the somatic characteristic of each alteration and avoid polymorphisms, the constitutional DNA of each patient was also tested with Sanger. After amplification, PCR products were purified conforming to the Agencourt AMPure XP PCR purification protocol (Beckman Coulter, Villepinte, France) with the Biomek NX Automation Workstation. Sequencing reactions were performed in both directions using the Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Extension products were purified with the Agencourt CleanSEQ protocol according to manufacturer's instructions (Beckman Coulter). Purified sequences were analyzed on an ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Forward and reverse sequences were systematically analyzed.

Statistical analysis

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

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



- 12 Cesari R, Martin ES, Calin GA, Pentimalli F, Bichi R, McAdams H et al. Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 5956–5961.
- 13 Letessier A, Garrido-Urbani S, Ginestier C, Fournier G, Esterni B, Monville F et al. Correlated break at PARK2/FRA6E and loss of AF-6/Afadin protein expression are associated with poor outcome in breast cancer. Oncogene 2007; 26: 298–307.
- 14 Poulogiannis G, McIntyre RE, Dimitriadi M, Apps JR, Wilson CH, Ichimura K et al. PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 15145–15150.
- 15 Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y et al. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. Oncogene 2008; 27: 6002–6011.
- 16 Veeriah S, Taylor BS, Meng S, Fang F, Yilmaz E, Vivanco I et al. Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. Nat Genet 2010; 42: 77–82.
- 17 da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A *et al.* Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1370–1375.
- 18 Rotter V. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 2613–2617.
- 19 Miyashita T, reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; **80**: 293–299.
- 20 Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 1994; 54: 3131–3135.
- 21 Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 1099–1109.
- 22 Hemann MT, Lowe SW. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ* 2006; 13: 1256–1259.
- 23 Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 1351–1359.
- 24 Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA *et al.* Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. Oncogene 1994; **9**: 1799–1805.
- 25 Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N *et al.* Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* 1997; **3**: 523–530.
- 26 Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H et al. Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol* 1999; 1: 124–137.
- 27 Wang F, Denison S, Lai JP, Philips LA, Montoya D, Kock N et al. Parkin gene alterations in hepatocellular carcinoma. Genes Chromosomes Cancer 2004; 40: 85–96.
- 28 Henn IH, Gostner JM, Lackner P, Tatzelt J, Winklhofer KF. Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms. J Neurochem 2005; 92: 114–122.
- 29 Soussi T, Hamroun D, Hjortsberg L, Rubio-Nevado JM, Fournier JL, Beroud C. MUT-TP53 2.0: a novel versatile matrix for statistical analysis of TP53 mutations in human cancer. *Hum Mutat* 2010; **31**: 1020–1025.
- 30 Edlund K, Larsson O, Ameur A, Bunikis I, Gyllensten U, Leroy B et al. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: 9551–9556.
- 31 Costa SL, Paillaud E, Fages C, Rochette-Egly C, Plassat JL, Jouault H *et al.* Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma *in vitro*: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eur J Cancer* 2001; **37**: 520–530.
- 32 Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 151–157.

- 33 Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum Mutat 2007; 28: 622–629.
- 34 Ginsberg D, Oren M, Yaniv M, Piette J. Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene* 1990; **5**: 1285–1290.
- 35 Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997; **91**: 649–659.
- 36 Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 701–713.
- 37 Zhang C, Lin M, Wu R, Wang X, Yang B, Levine AJ et al. Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108: 16259–16264.
- 38 Picchio MC, Martin ES, Cesari R, Calin GA, Yendamuri S, Kuroki T et al. Alterations of the tumor suppressor gene Parkin in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 2720–2724.
- 39 Agirre X, Roman-Gomez J, Vazquez I, Jimenez-Velasco A, Garate L, Montiel-Duarte C et al. Abnormal methylation of the common PARK2 and PACRG promoter is associated with downregulation of gene expression in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia. Int J Cancer 2006; **118**: 1945–1953.
- 40 Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; **25**: 302–305.
- 41 Fulci G, Ishii N, Van Meir EG. p53 and brain tumors: from gene mutations to gene therapy. Brain Pathol 1998; 8: 599–613.
- 42 Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996; **6**: 217–223, discussion 23-4.
- 43 Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J *et al.* Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 5743–5750.
- 44 Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; **60**: 6788–6793.
- 45 Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; **387**: 296–299.
- 46 Midgley CA, Lane DP. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. Oncogene 1997; 15: 1179–1189.
- 47 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; **253**: 49–53.
- 48 Yeo CW, Ng FS, Chai C, Tan JM, Koh GR, Chong YK et al. Parkin pathway activation mitigates glioma cell proliferation and predicts patient survival. *Cancer Res* 2012; 72: 2543–2553.
- 49 Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da costa C, Vincent B *et al.* Presenilin-dependent transcriptional control of the A β -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of β APP and APLP. *Neuron* 2005; **46**: 541–554.
- 50 West AB, Lockhart PJ, O'Farell C, Farrer MJ. Identification of a novel gene linked to parkin via a bi-directional promoter. *J Mol Biol* 2003; **326**: 11–19.
- 51 Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Vincent B, Boyer N et al. Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. J Neurosci 2006; 26: 6377–6385.
- 52 Idbaih A, Marie Y, Pierron G, Brennetot C, Hoang-Xuan K, Kujas M et al. Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. Ann Neurol 2005; 58: 483–487.
- 53 Idbaih A, Marie Y, Lucchesi C, Pierron G, Manie E, Raynal V et al. BAC array CGH distinguishes mutually exclusive alterations that define clinicogenetic subtypes of gliomas. Int J Cancer 2008; **122**: 1778–1786.

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

Bibliographie

Abou-Sleiman, P.M., Hanna, M.G., and Wood, N.W. (2006). Genetic association studies of complex neurological diseases. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 77, 1302–1304.

Abramov, A.Y., Gegg, M., Grunewald, A., Wood, N.W., Klein, C., and Schapira, A.H.V. (2011). Bioenergetic Consequences of PINK1 Mutations in Parkinson Disease. PLOS ONE 6, e25622.

Aerts, L., Strooper, B.D., and Morais, V.A. (2015). PINK1 activation-turning on a promiscuous kinase. Biochem. Soc. Trans. 43, 280–286.

Agnihotri, S., Golbourn, B., Huang, X., Remke, M., Younger, S., Cairns, R.A., Chalil, A., Smith, C.A., Krumholtz, S.-L., Mackenzie, D., et al. (2016). PINK1 Is a Negative Regulator of Growth and the Warburg Effect in Glioblastoma. Cancer Res. 76, 4708–4719.

Akepati, V.R., Müller, E.-C., Otto, A., Strauss, H.M., Portwich, M., and Alexander, C. (2008). Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. J. Neurochem. 106, 372–383.

Akundi, R.S., Huang, Z., Eason, J., Pandya, J.D., Zhi, L., Cass, W.A., Sullivan, P.G., and Büeler, H. (2011). Increased Mitochondrial Calcium Sensitivity and Abnormal Expression of Innate Immunity Genes Precede Dopaminergic Defects in Pink1 -Deficient Mice. PLOS ONE 6, e16038.

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., et al. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat. Genet. 26, 211–215.

Alikhani, N., Guo, L., Yan, S., Du, H., Pinho, C.M., Chen, J.X., Glaser, E., and Yan, S.S. (2011). Decreased Proteolytic Activity of the Mitochondrial Amyloid- β Degrading Enzyme, PreP Peptidasome, in Alzheimer's Disease Brain Mitochondria. J. Alzheimers Dis. 27, 75–87.

Alves da Costa, C., Paitel, E., Mattson, M.P., Amson, R., Telerman, A., Ancolio, K., Checler, F., and Mattson, M.P. (2002). Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 4043–4048.

Alves da Costa, C., Sunyach, C., Pardossi-Piquard, R., Sévalle, J., Vincent, B., Boyer, N., Kawarai, T., Girardot, N., St George-Hyslop, P., and Checler, F. (2006). Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26, 6377–6385.

Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I., Thomas-Tikhonenko, A., and Thompson, C.B. (2007). Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. J. Clin. Invest. 117, 326–336.

Amo, T., Sato, S., Saiki, S., Wolf, A.M., Toyomizu, M., Gautier, C.A., Shen, J., Ohta, S., and Hattori, N. (2011). Mitochondrial membrane potential decrease caused by loss of PINK1 is not due to proton leak, but to respiratory chain defects. Neurobiol. Dis. 41, 111–118.

Anandatheerthavarada, H.K., Biswas, G., Robin, M.-A., and Avadhani, N.G. (2003). Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. J. Cell Biol. 161, 41–54.

Andreux, P.A., Houtkooper, R.H., and Auwerx, J. (2013). Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. Nat. Rev. Drug Discov. 12, 465–483.

Ankarcrona, M., and Hultenby, K. (2002). Presenilin-1 is located in rat mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295, 766–770.

Arlt, M.F., Herzog, T.J., Mutch, D.G., and Goodfellow, P.J. (1996). Loss of heterozygosity of chromosome 3p sequences is an infrequent event in endometrial cancer. Gynecol. Oncol. 60, 308–312.

von Arnim, C.A.F., Spoelgen, R., Peltan, I.D., Deng, M., Courchesne, S., Koker, M., Matsui, T., Kowa, H., Lichtenthaler, S.F., Irizarry, M.C., et al. (2006). GGA1 acts as a spatial switch altering amyloid precursor protein trafficking and processing. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26, 9913–9922.

Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.-J., Estaquier, J., and Blackstone, C. (2005). Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. J. Biol. Chem. 280, 35742–35750.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. Science 268, 225–232.

Asai, M., Yagishita, S., Iwata, N., Saido, T.C., Ishiura, S., and Maruyama, K. (2011). An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 25, 3720–3730.

Baba, A., Mitsumori, K., Yamada, M.K., Nishiyama, N., Matsuki, N., and Ikegaya, Y. (2003). Beta-amyloid prevents excitotoxicity via recruitment of glial glutamate transporters. Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 368, 234–238.

Bae, B.-I., Xu, H., Igarashi, S., Fujimuro, M., Agrawal, N., Taya, Y., Hayward, S.D., Moran, T.H., Montell, C., Ross, C.A., et al. (2005). p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. Neuron 47, 29–41.

Bagshaw, R.D., Pasternak, S.H., Mahuran, D.J., and Callahan, J.W. (2003). Nicastrin is a resident lysosomal membrane protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 300, 615–618.

Baloyannis, S.J. (2006). Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. 9, 119–126.

Baricault, L., Ségui, B., Guégand, L., Olichon, A., Valette, A., Larminat, F., and Lenaers, G. (2007). OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. Exp. Cell Res. 313, 3800–3808.

Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., and Reinherz, E.L. (1989). The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27). J. Immunol. Baltim. Md 1950 142, 283–287.

Batlevi, Y., and La Spada, A.R. (2011). Mitochondrial autophagy in neural function, neurodegenerative disease, neuron cell death, and aging. Neurobiol. Dis. 43, 46–51.

Baulac, S., LaVoie, M.J., Kimberly, W.T., Strahle, J., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J., and Xia, W. (2003). Functional γ -secretase complex assembly in Golgi/trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and γ -secretase substrates. Neurobiol. Dis. 14, 194–204.

Baulac, S., Lu, H., Strahle, J., Yang, T., Goldberg, M.S., Shen, J., Schlossmacher, M.G., Lemere, C.A., Lu, Q., and Xia, W. (2009). Increased DJ-1 expression under oxidative stress and in Alzheimer's disease brains. Mol. Neurodegener. 4, 12.

Bayer, T.A., Wirths, O., Bayer, T.A., and Wirths, O. (2010). Intracellular accumulation of amyloid-beta – a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 2, 8.

Beckett, C., Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., and Turner, A.J. (2012). Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma. Cell. Signal. 24, 402–409.

Bedford, L., Hay, D., Paine, S., Rezvani, N., Mee, M., Lowe, J., and Mayer, R.J. (2008a). Is malfunction of the ubiquitin proteasome system the primary cause of alpha-synucleinopathies and other chronic human neurodegenerative disease? Biochim. Biophys. Acta 1782, 683–690.

Bedford, L., Hay, D., Devoy, A., Paine, S., Powe, D.G., Seth, R., Gray, T., Topham, I., Fone, K., Rezvani, N., et al. (2008b). Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 28, 8189–8198.

Beilina, A., Van Der Brug, M., Ahmad, R., Kesavapany, S., Miller, D.W., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2005). Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 5703–5708.

Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., Makova, N.Z., and Turner, A.J. (2009). Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. EMBO Rep. 10, 94–100.

Belyaev, N.D., Kellett, K.A.B., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., Hooper, N.M., and Turner, A.J. (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. J. Biol. Chem. 285, 41443–41454.

Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. J. Cell Sci. 120, 838–848.

Berry, D.L., and Baehrecke, E.H. (2008). Autophagy functions in programmed cell death. Autophagy 4, 359–360.

Berthier, A., Navarro, S., Jiménez-Sáinz, J., Roglá, I., Ripoll, F., Cervera, J., and Pulido, R. (2011). PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells. Hum. Pathol. 42, 75–87.

Bialopiotrowicz, E., Szybinska, A., Kuzniewska, B., Buizza, L., Uberti, D., Kuznicki, J., and Wojda, U. (2012). Highly pathogenic Alzheimer's disease presenilin 1 P117R mutation causes a specific increase in p53 and p21 protein levels and cell cycle dysregulation in human lymphocytes. J. Alzheimers Dis. JAD 32, 397–415.

Birgisdottir, Å.B., Lamark, T., and Johansen, T. (2013). The LIR motif - crucial for selective autophagy. J. Cell Sci. 126, 3237–3247.

Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtininduced cell death. J. Cell Biol. 171, 603–614.

Blackinton, J.G., Anvret, A., Beilina, A., Olson, L., Cookson, M.R., and Galter, D. (2007). Expression of PINK1 mRNA in human and rodent brain and in Parkinson's disease. Brain Res. 1184, 10–16.

Bohm, C., Chen, F., Sevalle, J., Qamar, S., Dodd, R., Li, Y., Schmitt-Ulms, G., Fraser, P.E., and St George-Hyslop, P.H. (2015). Current and future implications of basic and translational research on amyloid- β peptide production and removal pathways. Mol. Cell. Neurosci. 66, 3–11.

Boldogh, I.R., Fehrenbacher, K.L., Yang, H.-C., and Pon, L.A. (2005). Mitochondrial movement and inheritance in budding yeast. Gene 354, 28–36.

Bonifati, V., Rohé, C.F., Breedveld, G.J., Fabrizio, E., De Mari, M., Tassorelli, C., Tavella, A., Marconi, R., Nicholl, D.J., Chien, H.F., et al. (2005). Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. Neurology 65, 87–95.

Borg, J.P., Ooi, J., Levy, E., and Margolis, B. (1996). The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein. Mol. Cell. Biol. 16, 6229–6241.

Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M.J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R., and Lipton, S.A. (2003). Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. Curr. Opin. Cell Biol. 15, 706–716.

Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., and Slater, E.C. (1977). Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. Annu. Rev. Biochem. 46, 955–966.

Buchanan, S.K., and Walker, J.E. (1996). Large-scale chromatographic purification of F1F0-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria. Biochem. J. 318 (Pt 1), 343–349.

Buhlman, L., Damiano, M., Bertolin, G., Ferrando-Miguel, R., Lombès, A., Brice, A., and Corti, O. (2014). Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance. Biochim. Biophys. Acta 1843, 2012–2026.

Burns, M.P., Zhang, L., Rebeck, G.W., Querfurth, H.W., and Moussa, C.E.-H. (2009). Parkin promotes intracellular Abeta1-42 clearance. Hum. Mol. Genet. 18, 3206–3216.

Busciglio, J., Gabuzda, D.H., Matsudaira, P., and Yankner, B.A. (1993). Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 2092–2096.

Busciglio, J., Pelsman, A., Wong, C., Pigino, G., Yuan, M., Mori, H., and Yankner, B.A. (2002). Altered Metabolism of the Amyloid β Precursor Protein Is Associated with Mitochondrial Dysfunction in Down's Syndrome. Neuron 33, 677–688.

Cai, Q., and Sheng, Z.-H. (2009). Moving or Stopping Mitochondria: Miro as a Traffic Cop by Sensing Calcium. Neuron 61, 493–496.

Caillé, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Müller, U., and Prochiantz, A. (2004). Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. Dev. Camb. Engl. 131, 2173–2181.

Calkins, M.J., Manczak, M., Mao, P., Shirendeb, U., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial biogenesis, defective axonal transport of mitochondria, abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. Hum. Mol. Genet. 20, 4515–4529.

Canevari, L., Clark, J.B., and Bates, T.E. (1999). beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. FEBS Lett. 457, 131–134.

Cao, X., and Südhof, T.C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. Science 293, 115–120.

Cao, M., Liu, F., Ji, F., Liang, J., Liu, L., Wu, Q., and Wang, T. (2013). Effect of c-Jun N-terminal kinase (JNK)/p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in morphine-induced tau protein hyperphosphorylation. Behav. Brain Res. 237, 249–255.

Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000). Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. J. Biol. Chem. 275, 30849–30854.

Cardoso, S.M., Santana, I., Swerdlow, R.H., and Oliveira, C.R. (2004). Mitochondria dysfunction of Alzheimer's disease cybrids enhances $A\beta$ toxicity. J. Neurochem. 89, 1417–1426.

Catalano, S.M., Dodson, E.C., Henze, D.A., Joyce, J.G., Krafft, G.A., and Kinney, G.G. (2006). The Role of Amyloid-Beta Derived Diffusible Ligands (ADDLs) in Alzheimer's Disease. Curr. Top. Med. Chem. 6, 597–608.

Cataldo, A.M., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Terio, N.B., Duff, K., Beard, M., Mathews, P.M., and Nixon, R.A. (2004). Presenilin mutations in familial Alzheimer disease and transgenic mouse models accelerate neuronal lysosomal pathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 63, 821–830.

Cesari, R., Martin, E.S., Calin, G.A., Pentimalli, F., Bichi, R., McAdams, H., Trapasso, F., Drusco, A., Shimizu, M., Masciullo, V., et al. (2003). Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25-q27. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 5956–5961.

Chami, M., Oulès, B., Szabadkai, G., Tacine, R., Rizzuto, R., and Paterlini-Bréchot, P. (2008). Role of SERCA1 Truncated Isoform in the Proapoptotic Calcium Transfer from ER to Mitochondria during ER Stress. Mol. Cell 32, 641–651. Chan, D.C. (2012). Fusion and Fission: Interlinked Processes Critical for Mitochondrial Health. Annu. Rev. Genet. 46, 265–287.

Chan, N.C., Salazar, A.M., Pham, A.H., Sweredoski, M.J., Kolawa, N.J., Graham, R.L.J., Hess, S., and Chan, D.C. (2011). Broad activation of the ubiquitin-proteasome system by Parkin is critical for mitophagy. Hum. Mol. Genet. 20, 1726–1737.

Chau, D.-M., Crump, C.J., Villa, J.C., Scheinberg, D.A., and Li, Y.-M. (2012). Familial Alzheimer Disease Presenilin-1 Mutations Alter the Active Site Conformation of γ -secretase. J. Biol. Chem. 287, 17288–17296.

Checler, F. (1995). Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. J. Neurochem. 65, 1431–1444.

Checler, F., and Alves da Costa, C. (2014a). Interplay between parkin and p53 governs a physiological homeostasis that is disrupted in Parkinson's disease and cerebral cancer. Neurodegener. Dis. 13, 118–121.

Checler, F., and Alves da Costa, C. (2014b). p53 in neurodegenerative diseases and brain cancers. Pharmacol. Ther. 142, 99–113.

Chen, H., and Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. Hum. Mol. Genet. 14, R283–R289.

Chen, H., and Chan, D.C. (2009). Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. Hum. Mol. Genet. 18, R169-176.

Chen, N., and Debnath, J. (2010). Autophagy and tumorigenesis. FEBS Lett. 584, 1427–1435.

Chen, Y., and Dorn, G.W. (2013). PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. Science 340, 471–475.

Chen, F., Gu, Y., Hasegawa, H., Ruan, X., Arawaka, S., Fraser, P., Westaway, D., Mount, H., and St George-Hyslop, P. (2002). Presenilin 1 mutations activate gamma 42-secretase but reciprocally inhibit epsilon-secretase cleavage of amyloid precursor protein (APP) and S3-cleavage of notch. J. Biol. Chem. 277, 36521–36526.

Chen, F., Hasegawa, H., Schmitt-Ulms, G., Kawarai, T., Bohm, C., Katayama, T., Gu, Y., Sanjo, N., Glista, M., Rogaeva, E., et al. (2006). TMP21 is a presenilin complex component that modulates γ -secretase but not ε -secretase activity. Nature 440, 1208–1212.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. J. Cell Biol. 160, 189–200.

Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. J. Biol. Chem. 280, 26185–26192.

Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., et al. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. J. Biol. Chem. 276, 21562–21570.

Cho, D.-H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. Science 324, 102–105.

Choi, J., Sullards, M.C., Olzmann, J.A., Rees, H.D., Weintraub, S.T., Bostwick, D.E., Gearing, M., Levey, A.I., Chin, L.-S., and Li, L. (2006). Oxidative Damage of DJ-1 Is Linked to Sporadic Parkinson and Alzheimer Diseases. J. Biol. Chem. 281, 10816–10824.

Choi, J., Batchu, V.V.K., Schubert, M., Castellani, R.J., and Russell, J.W. (2013). A novel PGC-1α isoform in brain localizes to mitochondria and associates with PINK1 and VDAC. Biochem. Biophys. Res. Commun. 435, 671–677.

Choi, J., Ravipati, A., Nimmagadda, V., Schubert, M., Castellani, R.J., and Russell, J.W. (2014). Potential roles of PINK1 for increased PGC-1 α -mediated mitochondrial fatty acid oxidation and their associations with Alzheimer disease and diabetes. Mitochondrion 18, 41–48.

Chou, C.-H., Lin, C.-C., Yang, M.-C., Wei, C.-C., Liao, H.-D., Lin, R.-C., Tu, W.-Y., Kao, T.-C., Hsu, C.-M., Cheng, J.-T., et al. (2012). GSK3beta-Mediated Drp1 Phosphorylation Induced Elongated Mitochondrial Morphology against Oxidative Stress. PLOS ONE 7, e49112.

Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. Am. J. Clin. Nutr. 71, 621s-629s.

Chu, C.T. (2010a). A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. Hum. Mol. Genet. 19, R28-37.

Chu, C.T. (2010b). Tickled PINK1: mitochondrial homeostasis and autophagy in recessive Parkinsonism. Biochim. Biophys. Acta 1802, 20–28.

Chui, D.H., Tanahashi, H., Ozawa, K., Ikeda, S., Checler, F., Ueda, O., Suzuki, H., Araki, W., Inoue, H., Shirotani, K., et al. (1999). Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. Nat. Med. 5, 560–564.

Chyung, J.H., and Selkoe, D.J. (2003). Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. J. Biol. Chem. 278, 51035–51043.

Chyung, J.H., Raper, D.M., and Selkoe, D.J. (2005). Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage. J. Biol. Chem. 280, 4383–4392.

Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 15927–15932.

Cirrito, J.R., and Holtzman, D.M. (2003). Amyloid beta and Alzheimer disease therapeutics: the devil may be in the details. J. Clin. Invest. 112, 321–323.

Cirrito, J.R., May, P.C., O'Dell, M.A., Taylor, J.W., Parsadanian, M., Cramer, J.W., Audia, J.E., Nissen, J.S., Bales, K.R., Paul, S.M., et al. (2003). In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 23, 8844–8853.

Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A.Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D.J. (1992). Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. Nature 360, 672–674.

Clark, I.E., Dodson, M.W., Jiang, C., Cao, J.H., Huh, J.R., Seol, J.H., Yoo, S.J., Hay, B.A., and Guo, M. (2006). Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. Nature 441, 1162–1166.

Cook, D.G., Leverenz, J.B., McMillan, P.J., Kulstad, J.J., Ericksen, S., Roth, R.A., Schellenberg, G.D., Jin, L.-W., Kovacina, K.S., and Craft, S. (2003). Reduced hippocampal insulin-degrading enzyme in late-onset Alzheimer's disease is associated with the apolipoprotein E-epsilon4 allele. Am. J. Pathol. 162, 313–319.

Corsetti, V., Florenzano, F., Atlante, A., Bobba, A., Ciotti, M.T., Natale, F., Della Valle, F., Borreca, A., Manca, A., Meli, G., et al. (2015). NH2-truncated human tau induces deregulated mitophagy in neurons by aberrant recruitment of Parkin and UCHL-1: implications in Alzheimer's disease. Hum. Mol. Genet. 24, 3058–3081.

Corti, O., Lesage, S., and Brice, A. (2011). What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease. Physiol. Rev. 91, 1161–1218.

Cosson, P., Marchetti, A., Ravazzola, M., and Orci, L. (2012). Mitofusin-2 independent juxtaposition of endoplasmic reticulum and mitochondria: an ultrastructural study. PloS One 7, e46293.

Coussens, L.M., Zitvogel, L., and Palucka, A.K. (2013). Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? Science 339, 286–291.

Coutte, L., Dreyer, C., Sablin, M.-P., Faivre, S., and Raymond, É. (2012). Rôle de la voie PI3K-AKT-mTOR dans le cancer et les thérapeutiques antitumorales. Bull. Cancer (Paris) 99, 173–180.

Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006a). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. Cell 126, 121–134.

Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006b). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. Cell 126, 121–134.

Crighton, D., Wilkinson, S., and Ryan, K.M. (2007). DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death. Autophagy 3, 72–74.

Crouch, P.J., Blake, R., Duce, J.A., Ciccotosto, G.D., Li, Q.-X., Barnham, K.J., Curtain, C.C., Cherny, R.A., Cappai, R., Dyrks, T., et al. (2005). Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 25, 672–679.

Cuello, A.C. (2005). Intracellular and Extracellular A β , a Tale of Two Neuropathologies. Brain Pathol. 15, 66–71.

Cupers, P., Orlans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., and De Strooper, B. (2001a). The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. J. Neurochem. 78, 1168–1178.

Cupers, P., Bentahir, M., Craessaerts, K., Orlans, I., Vanderstichele, H., Saftig, P., De Strooper, B., and Annaert, W. (2001b). The discrepancy between presenilin subcellular localization and gamma-secretase processing of amyloid precursor protein. J. Cell Biol. 154, 731–740.

Czech, C., Tremp, G., and Pradier, L. (2000). Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanisms. Prog. Neurobiol. 60, 363–384.

Dagda, R.K., Cherra, S.J., Kulich, S.M., Tandon, A., Park, D., and Chu, C.T. (2009). Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. J. Biol. Chem. 284, 13843–13855.

D'Amelio, M., Ragonese, P., Morgante, L., Epifanio, A., Callari, G., Salemi, G., and Savettieri, G. (2004). Tumor diagnosis preceding Parkinson's disease: a case-control study. Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc. 19, 807–811.

Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. Science 302, 819–822.

Deane, R., Du Yan, S., Submamaryan, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., et al. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. Nat. Med. 9, 907–913.

Deas, E., Plun-Favreau, H., and Wood, N.W. (2009). PINK1 function in health and disease. EMBO Mol. Med. 1, 152–165.

De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., and Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. Nature 476, 336–340.

De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. Neuron 38, 9–12.

De Strooper, B. (2014). Lessons from a failed γ-secretase Alzheimer trial. Cell 159, 721–726.

De Strooper, B., and Annaert, W. (2000). Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. J. Cell Sci. 113 (Pt 11), 1857–1870.

De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. Nature 391, 387–390.

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., et al. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. Cancer Cell 10, 51–64.

Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat. Genet. 26, 207–210.

Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H., and Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 14503–14508.

Deretic, V., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). Autophagy in infection, inflammation and immunity. Nat. Rev. Immunol. 13, 722–737.

Desai, S.P., Bhatia, S.N., Toner, M., and Irimia, D. (2013). Mitochondrial localization and the persistent migration of epithelial cancer cells. Biophys. J. 104, 2077–2088.

Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 870–879.

Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, F., Agid, Y., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1989a). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. J. Neurochem. 52, 1830–1836.

Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1989b). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. J. Neurochem. 52, 381–389.

Donoviel, D.B., Hadjantonakis, A.K., Ikeda, M., Zheng, H., Hyslop, P.S., and Bernstein, A. (1999). Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. Genes Dev. 13, 2801–2810.

Doody, R.S., Raman, R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., He, F., Sun, X., Thomas, R.G., et al. (2013). A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. N. Engl. J. Med. 369, 341–350.

Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkentin, J.D., et al. (2008). Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. Nat. Med. 14, 1097–1105.

Du, H., Guo, L., Yan, S., Sosunov, A.A., McKhann, G.M., and Yan, S.S. (2010). Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 18670–18675.

DuBoff, B., Götz, J., and Feany, M.B. (2012). Tau Promotes Neurodegeneration via DRP1 Mislocalization In Vivo. Neuron 75, 618–632.

Dumanchin-Njock, C., Alves da Costa, C.A., Mercken, L., Pradier, L., and Checler, F. (2001). The caspasederived C-terminal fragment of betaAPP induces caspase-independent toxicity and triggers selective increase of Abeta42 in mammalian cells. J. Neurochem. 78, 1153–1161.

Dumont, M., and Beal, M.F. (2011). Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer's disease. Free Radic. Biol. Med. 51, 1014–1026.

Dumont, M., Lin, M.T., and Beal, M.F. (2010). Mitochondria and antioxidant targeted therapeutic strategies for Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD 20 Suppl 2, S633-643.

Duplan, E., Sevalle, J., Viotti, J., Goiran, T., Bauer, C., Renbaum, P., Levy-Lahad, E., Gautier, C.A., Corti, O., Leroudier, N., et al. (2013). Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription. J. Mol. Cell Biol. 5, 132–142.

Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M.F., Attardi, G., Larsson, N.-G., et al. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. J. Biol. Chem. 281, 37972–37979.

Eckman, E.A., and Eckman, C.B. (2005). Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. Biochem. Soc. Trans. 33, 1101–1105.

Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Insulin-degrading Enzyme Rapidly Removes the β-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD). J. Biol. Chem. 277, 13389–13393.

Edbauer, D., Winkler, E., Regula, J.T., Pesold, B., Steiner, H., and Haass, C. (2003). Reconstitution of gamma-secretase activity. Nat. Cell Biol. 5, 486–488.

Ehses, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.-C., Westermann, B., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2009). Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. J. Cell Biol. 187, 1023–1036.

Endres, K., and Fahrenholz, F. (2011). Regulation of alpha-secretase ADAM10 expression and activity. Exp. Brain Res. 217, 343–352.

Ernster, L., and Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. J. Cell Biol. 91, 227s-255s.

Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. Science 248, 1122–1124.

Esselens, C., Oorschot, V., Baert, V., Raemaekers, T., Spittaels, K., Serneels, L., Zheng, H., Saftig, P., De Strooper, B., Klumperman, J., et al. (2004). Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway. J. Cell Biol. 166, 1041–1054.

Esteves, A.R., Lu, J., Rodova, M., Onyango, I., Lezi, E., Dubinsky, R., Lyons, K.E., Pahwa, R., Burns, J.M., Cardoso, S.M., et al. (2010). Mitochondrial respiration and respiration-associated proteins in cell lines created through Parkinson's subject mitochondrial transfer. J. Neurochem. 113, 674–682.

Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., and Mihara, K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. J. Biochem. (Tokyo) 134, 333–344.

Exner, N., Treske, B., Paquet, D., Holmström, K., Schiesling, C., Gispert, S., Carballo-Carbajal, I., Berg, D., Hoepken, H.-H., Gasser, T., et al. (2007). Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 12413–12418.

Falkevall, A., Alikhani, N., Bhushan, S., Pavlov, P.F., Busch, K., Johnson, K.A., Eneqvist, T., Tjernberg, L., Ankarcrona, M., and Glaser, E. (2006). Degradation of the Amyloid β -Protein by the Novel Mitochondrial Peptidasome, PreP. J. Biol. Chem. 281, 29096–29104.

Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E.A., Frosch, M.P., Eckman, C.B., Tanzi, R.E., Selkoe, D.J., and Guénette, S. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 4162–4167.

Fedorowicz, M.A., de Vries-Schneider, R.L.A., Rüb, C., Becker, D., Huang, Y., Zhou, C., Alessi Wolken, D.M., Voos, W., Liu, Y., and Przedborski, S. (2014). Cytosolic cleaved PINK1 represses Parkin translocation to mitochondria and mitophagy. EMBO Rep. 15, 86–93.

Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J., and Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 8204–8209.

Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. Cancer Res. 67, 3043–3053.

Ferraris, A., Ialongo, T., Passali, G.C., Pellecchia, M.T., Brusa, L., Laruffa, M., Guidubaldi, A., Paludetti, G., Albanese, A., Barone, P., et al. (2009). Olfactory dysfunction in Parkinsonism caused by PINK1 mutations. Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc. 24, 2350–2357.

Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., and Pizzo, P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, E2174-2181.

Fitzgerald, J.C., and Plun-Favreau, H. (2008). Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: autosomal-recessive genes in Parkinson's disease--a common pathway? FEBS J. 275, 5758–5766.

Flammang, B., Pardossi-Piquard, R., Sevalle, J., Debayle, D., Dabert-Gay, A.-S., Thévenet, A., Lauritzen, I., and Checler, F. (2012). Evidence that the amyloid- β protein precursor intracellular domain, AICD, derives from β -secretase-generated C-terminal fragment. J. Alzheimers Dis. JAD 30, 145–153.

Francis, R., McGrath, G., Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M., Hai, B., Ellis, M.C., et al. (2002). aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. Dev. Cell 3, 85–97.

Frere, S., and Slutsky, I. (2016). Targeting PTEN interactions for Alzheimer's disease. Nat. Neurosci. 19, 416–418.

Fu, Z., and Tindall, D.J. (2008). FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. Oncogene 27, 2312–2319.

Furukawa, K., Sopher, B.L., Rydel, R.E., Begley, J.G., Pham, D.G., Martin, G.M., Fox, M., and Mattson, M.P. (1996). Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. J. Neurochem. 67, 1882–1896.

Gai, W.P., Yuan, H.X., Li, X.Q., Power, J.T.H., Blumbergs, P.C., and Jensen, P.H. (2000). In Situ and in Vitro Study of Colocalization and Segregation of α -Synuclein, Ubiquitin, and Lipids in Lewy Bodies. Exp. Neurol. 166, 324–333.

Gaki, G.S., and Papavassiliou, A.G. (2014). Oxidative Stress-Induced Signaling Pathways Implicated in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. NeuroMolecular Med. 16, 217–230.

Gan, B., Lim, C., Chu, G., Hua, S., Ding, Z., Collins, M., Hu, J., Jiang, S., Fletcher-Sananikone, E., Zhuang, L., et al. (2010). FoxOs enforce a progression checkpoint to constrain mTORC1-activated renal tumorigenesis. Cancer Cell 18, 472–484.

Gandhi, S., Muqit, M.M.K., Stanyer, L., Healy, D.G., Abou-Sleiman, P.M., Hargreaves, I., Heales, S., Ganguly, M., Parsons, L., Lees, A.J., et al. (2006). PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. Brain J. Neurol. 129, 1720–1731.

Gandhi, S., Wood-Kaczmar, A., Yao, Z., Plun-Favreau, H., Deas, E., Klupsch, K., Downward, J., Latchman, D.S., Tabrizi, S.J., Wood, N.W., et al. (2009). PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. Mol. Cell 33, 627–638.

Gautier, C.A., Kitada, T., and Shen, J. (2008). Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 11364–11369.

Gautier, C.A., Giaime, E., Caballero, E., Núñez, L., Song, Z., Chan, D., Villalobos, C., and Shen, J. (2012). Regulation of mitochondrial permeability transition pore by PINK1. Mol. Neurodegener. 7, 22.

Gegg, M.E., Cooper, J.M., Schapira, A.H.V., and Taanman, J.-W. (2009). Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. PloS One 4, e4756.

Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.-Y., Rojo, M., Schapira, A.H.V., and Taanman, J.-W. (2010). Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. Hum. Mol. Genet. 19, 4861–4870.

Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. Nat. Cell Biol. 12, 119–131.

George, A.J., Gordon, L., Beissbarth, T., Koukoulas, I., Holsinger, R.M.D., Perreau, V., Cappai, R., Tan, S.-S., Masters, C.L., Scott, H.S., et al. (2010). A serial analysis of gene expression profile of the Alzheimer's disease Tg2576 mouse model. Neurotox. Res. 17, 360–379.

Georgopoulou, N., McLaughlin, M., McFarlane, I., and Breen, K.C. (2001). The role of post-translational modification in beta-amyloid precursor protein processing. Biochem. Soc. Symp. 23–36.

Ghosal, K., Vogt, D.L., Liang, M., Shen, Y., Lamb, B.T., and Pimplikar, S.W. (2009). Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 18367–18372.

Gibson, G.E., Starkov, A., Blass, J.P., Ratan, R.R., and Beal, M.F. (2010). Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. Biochim. Biophys. Acta 1802, 122–134.

Gispert, S., Ricciardi, F., Kurz, A., Azizov, M., Hoepken, H.-H., Becker, D., Voos, W., Leuner, K., Müller, W.E., Kudin, A.P., et al. (2009). Parkinson Phenotype in Aged PINK1-Deficient Mice Is Accompanied by Progressive Mitochondrial Dysfunction in Absence of Neurodegeneration. PLOS ONE 4, e5777.

Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S., and Schwarz, T.L. (2006). Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. J. Cell Biol. 173, 545–557.

Glauser, L., Sonnay, S., Stafa, K., and Moore, D.J. (2011). Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. J. Neurochem. 118, 636–645.

Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885–890.

Gong, Y., Zack, T.I., Morris, L.G.T., Lin, K., Hukkelhoven, E., Raheja, R., Tan, I.-L., Turcan, S., Veeriah, S., Meng, S., et al. (2014). Pan-cancer genetic analysis identifies PARK2 as a master regulator of G1/S cyclins. Nat. Genet. 46, 588–594.

Goodger, Z.V., Rajendran, L., Trutzel, A., Kohli, B.M., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2009). Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. J. Cell Sci. 122, 3703–3714.

Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2010). p53 regulation of metabolic pathways. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2, a001040.

Gouras, G.K., Almeida, C.G., and Takahashi, R.H. (2005). Intraneuronal A β accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 26, 1235–1244.

Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A., and Priess, J.R. (2002). APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in Caenorhabditis elegans embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 775–779.

Grbovic, O.M., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Dinakar, R., Summers-Terio, N.B., Ceresa, B.P., Nixon, R.A., and Cataldo, A.M. (2003). Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and Abeta production. J. Biol. Chem. 278, 31261–31268.

Greenfield, J.P., Leung, L.W., Cai, D., Kaasik, K., Gross, R.S., Rodriguez-Boulan, E., Greengard, P., and Xu, H. (2002). Estrogen lowers Alzheimer beta-amyloid generation by stimulating trans-Golgi network vesicle biogenesis. J. Biol. Chem. 277, 12128–12136.

Gregori, L., Fuchs, C., Figueiredo-Pereira, M.E., Van Nostrand, W.E., and Goldgaber, D. (1995). Amyloid betaprotein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. J. Biol. Chem. 270, 19702–19708.

Griffin, R.J., Moloney, A., Kelliher, M., Johnston, J.A., Ravid, R., Dockery, P., O'Connor, R., and O'Neill, C. (2005). Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. J. Neurochem. 93, 105–117.

Grimm, M.O., Mett, J., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., and Hartmann, T. (2013). Neprilysin and $A\beta$ clearance: impact of the APP intracellular domain in NEP regulation and implications in Alzheimer's disease. Front. Aging Neurosci. 5, 98.

Grünewald, A., Gegg, M.E., Taanman, J.-W., King, R.H., Kock, N., Klein, C., and Schapira, A.H.V. (2009). Differential effects of PINK1 nonsense and missense mutations on mitochondrial function and morphology. Exp. Neurol. 219, 266–273.

Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001). Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. J. Biol. Chem. 276, 35235–35238.

Guénette, S.Y., Chen, J., Jondro, P.D., and Tanzi, R.E. (1996). Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 10832–10837.

Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombès, A., Belenguer, P., Arnoult, D., and Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. Biol. Cell 100, 315–325.

Guo, J.Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M.S., Karantza, V., et al. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Dev. 25, 460–470.

Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Mathew, R., Aisner, S.C., Kamphorst, J.J., Strohecker, A.M., Chen, G., Price, S., Lu, W., Teng, X., et al. (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. Genes Dev. 27, 1447–1461.

Guo, Q., Sopher, B.L., Furukawa, K., Pham, D.G., Robinson, N., Martin, G.M., and Mattson, M.P. (1997). Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 17, 4212–4222.

Guo, Q., Christakos, S., Robinson, N., and Mattson, M.P. (1998). Calbindin D28k blocks the proapoptotic actions of mutant presenilin 1: Reduced oxidative stress and preserved mitochondrial function. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 3227–3232.

Gupta-Rossi, N., Six, E., LeBail, O., Logeat, F., Chastagner, P., Olry, A., Israël, A., and Brou, C. (2004). Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. J. Cell Biol. 166, 73–83.

Haapasalo, A., and Kovacs, D.M. (2011). The many substrates of presenilin/ γ -secretase. J. Alzheimers Dis. JAD 25, 3–28.

Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006270.

Hagenbuchner, J., Kuznetsov, A.V., Obexer, P., and Ausserlechner, M.J. (2013). BIRC5/Survivin enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. Oncogene 32, 4748–4757.

Hamid, R., Kilger, E., Willem, M., Vassallo, N., Kostka, M., Bornhövd, C., Reichert, A.S., Kretzschmar, H.A., Haass, C., and Herms, J. (2007). Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content. J. Neurochem. 102, 1264–1275.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646–674.

Hansson, E.M., Strömberg, K., Bergstedt, S., Yu, G., Näslund, J., Lundkvist, J., and Lendahl, U. (2005). Aph-1 interacts at the cell surface with proteins in the active gamma-secretase complex and membrane-tethered Notch. J. Neurochem. 92, 1010–1020.

Hansson Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E., et al. (2008). The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 13145–13150.

Haque, M.E., Thomas, K.J., D'Souza, C., Callaghan, S., Kitada, T., Slack, R.S., Fraser, P., Cookson, M.R., Tandon, A., and Park, D.S. (2008a). Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 1716–1721.

Haque, M.E., Thomas, K.J., D'Souza, C., Callaghan, S., Kitada, T., Slack, R.S., Fraser, P., Cookson, M.R., Tandon, A., and Park, D.S. (2008b). Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 1716–1721.

Hasson, S.A., Kane, L.A., Yamano, K., Huang, C.-H., Sliter, D.A., Buehler, E., Wang, C., Heman-Ackah, S.M., Hessa, T., Guha, R., et al. (2013). High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. Nature 504, 291–295.

Hauptmann, S., Scherping, I., Dröse, S., Brandt, U., Schulz, K.L., Jendrach, M., Leuner, K., Eckert, A., and Müller, W.E. (2009). Mitochondrial dysfunction: An early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. Neurobiol. Aging 30, 1574–1586.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu. Rev. Genet. 43, 67–93.

He, Y., Wang, J., Liu, X., Zhang, L., Yi, G., Li, C., He, X., Wang, P., and Jiang, H. (2010). Toosendanin inhibits hepatocellular carcinoma cells by inducing mitochondria-dependent apoptosis. Planta Med. 76, 1447–1453.

Hébert, S.S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M.A., Müller, U., and De Strooper, B. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. EMBO Rep. 7, 739–745.

Hedskog, L., Pinho, C.M., Filadi, R., Rönnbäck, A., Hertwig, L., Wiehager, B., Larssen, P., Gellhaar, S., Sandebring, A., Westerlund, M., et al. (2013). Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 7916–7921.

Heeman, B., Haute, C.V. den, Aelvoet, S.-A., Valsecchi, F., Rodenburg, R.J., Reumers, V., Debyser, Z., Callewaert, G., Koopman, W.J.H., Willems, P.H.G.M., et al. (2011). Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance. J Cell Sci 124, 1115–1125.

Henze, K., and Martin, W. (2003). Evolutionary biology: Essence of mitochondria. Nature 426, 127–128.

Herreman, A., Gassen, G.V., Bentahir, M., Nyabi, O., Craessaerts, K., Mueller, U., Annaert, W., and Strooper, B.D. (2003). γ -Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation. J. Cell Sci. 116, 1127–1136.

Higuchi, Y., Hashiguchi, A., Yuan, J., Yoshimura, A., Mitsui, J., Ishiura, H., Tanaka, M., Ishihara, S., Tanabe, H., Nozuma, S., et al. (2016). Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2. Ann. Neurol. 79, 659–672.

Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R.L., Atwood, C.S., Johnson, A.B., Kress, Y., Vinters, H.V., Tabaton, M., et al. (2001). Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 21, 3017–3023.

Hoareau, C., Borrell, V., Soriano, E., Krebs, M.O., Prochiantz, A., and Allinquant, B. (2008). Amyloid precursor protein cytoplasmic domain antagonizes reelin neurite outgrowth inhibition of hippocampal neurons. Neurobiol. Aging 29, 542–553.

Hoepken, H.-H., Gispert, S., Morales, B., Wingerter, O., Del Turco, D., Mülsch, A., Nussbaum, R.L., Müller, K., Dröse, S., Brandt, U., et al. (2007). Mitochondrial dysfunction, peroxidation damage and changes in glutathione metabolism in PARK6. Neurobiol. Dis. 25, 401–411.

Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. J. Cell Sci. 118, 5411–5419.

Hong, X., Liu, J., Zhu, G., Zhuang, Y., Suo, H., Wang, P., Huang, D., Xu, J., Huang, Y., Yu, M., et al. (2014). Parkin overexpression ameliorates hippocampal long-term potentiation and β -amyloid load in an Alzheimer's disease mouse model. Hum. Mol. Genet. 23, 1056–1072.

Hong, Y., Beckett, C., Belyaev, N.D., and Turner, A.J. (2012). The impact of amyloid precursor protein signalling and histone deacetylase inhibition on neprilysin expression in human prostate cells. Int. J. Cancer 130, 775–786.

Hook, V.Y.H., Kindy, M., Reinheckel, T., Peters, C., and Hook, G. (2009). Genetic cathepsin B deficiency reduces β -amyloid in transgenic mice expressing human wild-type amyloid precursor protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 386, 284–288.

Hotoda, N., Koike, H., Sasagawa, N., and Ishiura, S. (2002). A secreted form of human ADAM9 has an α -secretase activity for APP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 800–805.

Ibáñez, P., Lesage, S., Lohmann, E., Thobois, S., De Michele, G., Borg, M., Agid, Y., Dürr, A., Brice, A., and French Parkinson's Disease Genetics Study Group (2006). Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. Brain J. Neurol. 129, 686–694.

Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2008). Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. J. Biol. Chem. 283, 22847–22857.

Iijima-Ando, K., Hearn, S.A., Shenton, C., Gatt, A., Zhao, L., and Iijima, K. (2009). Mitochondrial Mislocalization Underlies A β 42-Induced Neuronal Dysfunction in a Drosophila Model of Alzheimer's Disease. PLOS ONE 4, e8310.

Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M., et al. (2011). Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. J. Cell Biol. 193, 275–284.

Inzelberg, R., and Jankovic, J. (2007). Are Parkinson disease patients protected from some but not all cancers? Neurology 69, 1542–1550.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. EMBO J. 25, 2966–2977.

Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., et al. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. Nat. Cell Biol. 11, 958–966.

Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., and Dickson, D.W. (2003). Colocalization of Tau and Alpha-Synuclein Epitopes in Lewy Bodies. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62, 389–397.

Jalkute, C.B., Barage, S.H., Dhanavade, M.J., and Sonawane, K.D. (2013). Molecular Dynamics Simulation and Molecular Docking Studies of Angiotensin Converting Enzyme with Inhibitor Lisinopril and Amyloid Beta Peptide. Protein J. 32, 356–364.

Jarrett, J.T., Berger, E.P., and Lansbury, P.T. (1993). The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. Biochemistry (Mosc.) 32, 4693–4697.

Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. J. Cell Biol. 191, 933–942.

Jo, J., Whitcomb, D.J., Olsen, K.M., Kerrigan, T.L., Lo, S.-C., Bru-Mercier, G., Dickinson, B., Scullion, S., Sheng, M., Collingridge, G., et al. (2011). $A\beta(1-42)$ inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 β . Nat. Neurosci. 14, 545–547.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. Mol. Cell 18, 283–293.

Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. Nature 488, 96–99.

Kaech, S., and Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. Nat. Protoc. 1, 2406–2415.

Kaether, C., Lammich, S., Edbauer, D., Ertl, M., Rietdorf, J., Capell, A., Steiner, H., and Haass, C. (2002). Presenilin-1 affects trafficking and processing of betaAPP and is targeted in a complex with nicastrin to the plasma membrane. J. Cell Biol. 158, 551–561.

Kaether, C., Schmitt, S., Willem, M., and Haass, C. (2006a). Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface. Traffic Cph. Den. 7, 408–415.

Kaether, C., Haass, C., and Steiner, H. (2006b). Assembly, Trafficking and Function of γ -Secretase. Neurodegener. Dis. 3, 275–283.

Kageyama, Y., Hoshijima, M., Seo, K., Bedja, D., Sysa-Shah, P., Andrabi, S.A., Chen, W., Höke, A., Dawson, V.L., Dawson, T.M., et al. (2014). Parkin-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. EMBO J. 33, 2798–2813.

Kakuda, N., Funamoto, S., Yagishita, S., Takami, M., Osawa, S., Dohmae, N., and Ihara, Y. (2006). Equimolar production of amyloid beta-protein and amyloid precursor protein intracellular domain from beta-carboxyl-terminal fragment by gamma-secretase. J. Biol. Chem. 281, 14776–14786.

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. Neuron 37, 925–937.

Kametani, F., Tanaka, K., Ishii, T., Ikeda, S., Kennedy, H.E., and Allsop, D. (1993). Secretory form of Alzheimer amyloid precursor protein 695 in human brain lacks beta/A4 amyloid immunoreactivity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 392–398.

Kamino, H., Nakamura, Y., Tsuneki, M., Sano, H., Miyamoto, Y., Kitamura, N., Futamura, M., Kanai, Y., Taniguchi, H., Shida, D., et al. (2016). Mieap-regulated mitochondrial quality control is frequently inactivated in human colorectal cancer. Oncogenesis 4, e181.

Kane, L.A., and Youle, R.J. (2011). PINK1 and Parkin Flag Miro to Direct Mitochondrial Traffic. Cell 147, 721–723.

Kang, D.E., Pietrzik, C.U., Baum, L., Chevallier, N., Merriam, D.E., Kounnas, M.Z., Wagner, S.L., Troncoso, J.C., Kawas, C.H., Katzman, R., et al. (2000). Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. J. Clin. Invest. 106, 1159–1166.

Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325, 733–736.

Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. Genes Dev. 21, 1621–1635.

Kasahara, A., Cipolat, S., Chen, Y., Dorn, G.W., and Scorrano, L. (2013). Mitochondrial fusion directs cardiomyocyte differentiation via calcineurin and Notch signaling. Science 342, 734–737.

Keller, J.N., Lauderback, C.M., Butterfield, D.A., Kindy, M.S., Yu, J., and Markesbery, W.R. (2000). Amyloid beta-peptide effects on synaptosomes from apolipoprotein E-deficient mice. J. Neurochem. 74, 1579–1586.

Kenzelmann Broz, D., and Attardi, L.D. (2013). TRP53 activates a global autophagy program to promote tumor suppression. Autophagy 9, 1440–1442.

Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Bieging, K.T., Jiang, D., Dusek, R.L., Brady, C.A., Sidow, A., and Attardi, L.D. (2013). Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. Genes Dev. 27, 1016–1031.

Khandelwal, P.J., Herman, A.M., Hoe, H.-S., Rebeck, G.W., and Moussa, C.E.-H. (2011). Parkin mediates beclin-dependent autophagic clearance of defective mitochondria and ubiquitinated A in AD models. Hum. Mol. Genet. 20, 2091–2102.

Kim, C., Choi, H., Jung, E.S., Lee, W., Oh, S., Jeon, N.L., and Mook-Jung, I. (2012). HDAC6 Inhibitor Blocks Amyloid Beta-Induced Impairment of Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons. PLOS ONE 7, e42983.

Kim, Y., Park, J., Kim, S., Song, S., Kwon, S.-K., Lee, S.-H., Kitada, T., Kim, J.-M., and Chung, J. (2008). PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 377, 975–980.

Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Guénette, S.Y., and Selkoe, D.J. (2001). The intracellular domain of the betaamyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. J. Biol. Chem. 276, 40288–40292.

Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., and Selkoe, D.J. (2003). Gammasecretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 6382–6387.

Kimmelman, A.C. (2015). Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 21, 1828–1834.

Kinoshita, A., Whelan, C.M., Smith, C.J., Berezovska, O., and Hyman, B.T. (2002a). Direct visualization of the gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein: association with Fe65 and translocation to the nucleus. J. Neurochem. 82, 839–847.

Kinoshita, A., Whelan, C.M., Berezovska, O., and Hyman, B.T. (2002b). The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. J. Biol. Chem. 277, 28530–28536.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature 392, 605–608.

Kitada, T., Pisani, A., Porter, D.R., Yamaguchi, H., Tscherter, A., Martella, G., Bonsi, P., Zhang, C., Pothos, E.N., and Shen, J. (2007). Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 11441–11446.

Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. Nature 331, 530–532.

Kitamura, N., Nakamura, Y., Miyamoto, Y., Miyamoto, T., Kabu, K., Yoshida, M., Futamura, M., Ichinose, S., and Arakawa, H. (2011). Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. PloS One 6, e16060.

Klein, C., Lohmann-Hedrich, K., Rogaeva, E., Schlossmacher, M.G., and Lang, A.E. (2007). Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. Lancet Neurol. 6, 652–662.

Kloet, D.E.A., and Burgering, B.M.T. (2011). The PKB/FOXO switch in aging and cancer. Biochim. Biophys. Acta 1813, 1926–1937.

von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H.T., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1997). Generation of APLP2 KO Mice and Early Postnatal Lethality in APLP2/APP Double KO Mice. Neurobiol. Aging 18, 661–669.

Koh, S.-H., Noh, M.Y., and Kim, S.H. (2008). Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. Brain Res. 1188, 254–262.

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., et al. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. J. Cell Biol. 169, 425–434.

Komendantov, A.O., Komendantova, O.G., Johnson, S.W., and Canavier, C.C. (2004). A Modeling Study Suggests Complementary Roles for GABAA and NMDA Receptors and the SK Channel in Regulating the Firing Pattern in Midbrain Dopamine Neurons. J. Neurophysiol. 91, 346–357.

Kondapalli, C., Kazlauskaite, A., Zhang, N., Woodroof, H.I., Campbell, D.G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T.J., Deak, M., et al. (2012). PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. Open Biol. 2, 120080.

Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R., and Kondo, S. (2005). The role of autophagy in cancer development and response to therapy. Nat. Rev. Cancer 5, 726–734.

Konietzko, U. (2012). AICD nuclear signaling and its possible contribution to Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. 9, 200–216.

Konietzko, U., Goodger, Z.V., Meyer, M., Kohli, B.M., Bosset, J., Lahiri, D.K., and Nitsch, R.M. (2010). Colocalization of the amyloid precursor protein and Notch intracellular domains in nuclear transcription factories. Neurobiol. Aging 31, 58–73.

Kopan, R. (2002). Notch: a membrane-bound transcription factor. J. Cell Sci. 115, 1095–1097.

Kops, G.J.P.L., Dansen, T.B., Polderman, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffer, P.J., Huang, T.-T., Bos, J.L., Medema, R.H., and Burgering, B.M.T. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. Nature 419, 316–321.

Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. Science 305, 858–862.

Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., et al. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. Nature 510, 162–166.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 1004–1010.

Kubli, D.A., and Gustafsson, Å.B. (2012). Mitochondria and Mitophagy: The Yin and Yang of Cell Death Control. Circ. Res. 111, 1208–1221.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature 432, 1032–1036.

Kume, H., Maruyama, K., and Kametani, F. (2004). Intracellular domain generation of amyloid precursor protein by epsilon-cleavage depends on C-terminal fragment by alpha-secretase cleavage. Int. J. Mol. Med. 13, 121–125.

Kuzuhara, S., Mori, H., Izumiyama, N., Yoshimura, M., and Ihara, Y. Lewy bodies are ubiquitinated. Acta Neuropathol. (Berl.) 75, 345–353.

LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. Nat. Rev. Neurosci. 8, 499–509.

Lai, A., Gibson, A., Hopkins, C.R., and Trowbridge, I.S. (1998). Signal-dependent trafficking of beta-amyloid precursor protein-transferrin receptor chimeras in madin-darby canine kidney cells. J. Biol. Chem. 273, 3732–3739.

Lam, F.C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A.B., Renoir, J.M., Sharom, F.J., and Reiner, P.B. (2001). beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. J. Neurochem. 76, 1121–1128.

Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358, 15-16.

Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.-A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., et al. (2004). Gain of Function of a p53 Hot Spot Mutation in a Mouse Model of Li-Fraumeni Syndrome. Cell 119, 861–872.

Langston, J.W., and Ballard, P.A. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. N. Engl. J. Med. 309, 310.

Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science 219, 979–980.

Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J.-D., Ranaldi, S., Fraser, P., St-George-Hyslop, P., Thuc, O.L., Espin, V., et al. (2012). The β -Secretase-Derived C-Terminal Fragment of β APP, C99, But Not A β , Is a Key Contributor to Early Intraneuronal Lesions in Triple-Transgenic Mouse Hippocampus. J. Neurosci. 32, 16243–16255.

Lazarou, M., Jin, S.M., Kane, L.A., and Youle, R.J. (2012). Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. Dev. Cell 22, 320–333.

Lazarou, M., Sliter, D.A., Kane, L.A., Sarraf, S.A., Wang, C., Burman, J.L., Sideris, D.P., Fogel, A.I., and Youle, R.J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. Nature 524, 309–314.

Lee, S., and Das, H.K. (2010). Transcriptional regulation of the presenilin-1 gene controls gamma-secretase activity. Front. Biosci. Elite Ed. 2, 22–35.

Lee, I.H., Kawai, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Bishop, A.J.R., Motoyama, N., Cao, L., and Finkel, T. (2012). Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. Science 336, 225–228.

Lee, J.-H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., et al. (2010). Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. Cell 141, 1146–1158.

Lee, J.-H., McBrayer, M.K., Wolfe, D.M., Haslett, L.J., Kumar, A., Sato, Y., Lie, P.P.Y., Mohan, P., Coffey, E.E., Kompella, U., et al. (2015). Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca2+ Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. Cell Rep. 12, 1430–1444.

Lemasters, J.J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. Rejuvenation Res. 8, 3–5.

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88, 323–331.

Levine, B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. Nature 446, 745–747.

Li, J., Li, Y., Qin, D., von Harsdorf, R., and Li, P. (2010). Mitochondrial fission leads to Smac/DIABLO release quenched by ARC. Apoptosis Int. J. Program. Cell Death 15, 1187–1196.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. Cell 91, 479–489.

Lichtenthaler, S.F. (2011). Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. J. Neurochem. 116, 10–21.

Lin, W., and Kang, U.J. (2008). Characterization of PINK1 processing, stability, and subcellular localization. J. Neurochem. 106, 464–474.

Ling, D., Song, H.-J., Garza, D., Neufeld, T.P., and Salvaterra, P.M. (2009). Abeta42-Induced Neurodegeneration via an Age-Dependent Autophagic-Lysosomal Injury in Drosophila. PLoS ONE 4.

Liu, D., Song, H., and Xu, Y. (2010). A common Gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. Oncogene 29, 949–956.

Liu, W., Vives-Bauza, C., Acín-Peréz-, R., Yamamoto, A., Tan, Y., Li, Y., Magrané, J., Stavarache, M.A., Shaffer, S., Chang, S., et al. (2009). PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. PloS One 4, e4597.

Lonskaya, I., Shekoyan, A.R., Hebron, M.L., Desforges, N., Algarzae, N.K., and Moussa, C.E.-H. (2013a). Diminished parkin solubility and co-localization with intraneuronal amyloid- β are associated with autophagic defects in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. JAD 33, 231–247.

Lonskaya, I., Hebron, M.L., Desforges, N.M., Franjie, A., and Moussa, C.E.-H. (2013b). Tyrosine kinase inhibition increases functional parkin-Beclin-1 interaction and enhances amyloid clearance and cognitive performance. EMBO Mol. Med. 5, 1247–1262.

Lord, A., Kalimo, H., Eckman, C., Zhang, X.-Q., Lannfelt, L., and Nilsson, L.N.G. (2006). The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal Abeta aggregation and senile plaque formation in transgenic mice. Neurobiol. Aging 27, 67–77.

Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. Mol. Biol. Cell 24, 659–667.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol. (Berl.) 114, 97–109.

Lu, D.C., Rabizadeh, S., Chandra, S., Shayya, R.F., Ellerby, L.M., Ye, X., Salvesen, G.S., Koo, E.H., and Bredesen, D.E. (2000). A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. Nat. Med. 6, 397–404.

Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., et al. (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. Science 304, 448–452.

Lutz, A.K., Exner, N., Fett, M.E., Schlehe, J.S., Kloos, K., Lämmermann, K., Brunner, B., Kurz-Drexler, A., Vogel, F., Reichert, A.S., et al. (2009). Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation. J. Biol. Chem. 284, 22938–22951.

Lynch-Day, M.A., and Klionsky, D.J. (2010). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. FEBS Lett. 584, 1359–1366.

MacKeigan, J.P., Murphy, L.O., and Blenis, J. (2005). Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. Nat. Cell Biol. 7, 591–600.

Madeo, G., Schirinzi, T., Martella, G., Latagliata, E.C., Puglisi, F., Shen, J., Valente, E.M., Federici, M., Mercuri, N.B., Puglisi-Allegra, S., et al. (2014). PINK1 heterozygous mutations induce subtle alterations in dopamine-dependent synaptic plasticity. Mov. Disord. 29, 41–53.

Madeo, G., Schirinzi, T., Maltese, M., Martella, G., Rapino, C., Fezza, F., Mastrangelo, N., Bonsi, P., Maccarrone, M., and Pisani, A. (2016). Dopamine-dependent CB1 receptor dysfunction at corticostriatal synapses in homozygous PINK1 knockout mice. Neuropharmacology 101, 460–470.

Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S.A., and Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. Curr. Opin. Cell Biol. 22, 181–185.

Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. Hum. Mol. Genet. 15, 1437–1449.

Manczak, M., Calkins, M.J., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. Hum. Mol. Genet. 20, 2495–2509.

Manolopoulos, K.N., Klotz, L.-O., Korsten, P., Bornstein, S.R., and Barthel, A. (2010). Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: the FoxO response to oxidative stress. Mol. Psychiatry 15, 1046–1052.

Marongiu, R., Spencer, B., Crews, L., Adame, A., Patrick, C., Trejo, M., Dallapiccola, B., Valente, E.M., and Masliah, E. (2009). Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux. J. Neurochem. 108, 1561–1574.

Martella, G., Platania, P., Vita, D., Sciamanna, G., Cuomo, D., Tassone, A., Tscherter, A., Kitada, T., Bonsi, P., Shen, J., et al. (2009). Enhanced sensitivity to group II mGlu receptor activation at corticostriatal synapses in mice lacking the familial parkinsonism-linked genes PINK1 or Parkin. Exp. Neurol. 215, 388–396.

Martin, S.A., Hewish, M., Sims, D., Lord, C.J., and Ashworth, A. (2011). Parallel high-throughput RNA interference screens identify PINK1 as a potential therapeutic target for the treatment of DNA mismatch repair-deficient cancers. Cancer Res. 71, 1836–1848.

Martín-Maestro, P., Gargini, R., Perry, G., Avila, J., and García-Escudero, V. (2016). PARK2 enhancement is able to compensate mitophagy alterations found in sporadic Alzheimer's disease. Hum. Mol. Genet. 25, 792–806.

Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985a). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 4245–4249.

Masters, C.L., Multhaup, G., Simms, G., Pottgiesser, J., Martins, R.N., and Beyreuther, K. (1985b). Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. EMBO J. 4, 2757–2763.

Matenia, D., and Mandelkow, E.M. (2014). Emerging modes of PINK1 signaling: another task for MARK2. Front. Mol. Neurosci. 7, 37.

Matenia, D., Hempp, C., Timm, T., Eikhof, A., and Mandelkow, E.-M. (2012). Microtubule Affinity-regulating Kinase 2 (MARK2) Turns on Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)-induced Kinase 1 (PINK1) at Thr-313, a Mutation Site in Parkinson Disease EFFECTS ON MITOCHONDRIAL TRANSPORT. J. Biol. Chem. 287, 8174–8186.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. Nat. Rev. Cancer 7, 961–967.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. Cell 137, 1062–1075.

Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Grbovic, O.M., Mercken, M., and Nixon, R.A. (2002). Calpain activity regulates the cell surface distribution of amyloid precursor protein. Inhibition of calpains enhances endosomal generation of beta-cleaved C-terminal APP fragments. J. Biol. Chem. 277, 36415–36424.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.-S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. J. Cell Biol. 189, 211–221.

Matsushima-Nishiu, M., Unoki, M., Ono, K., Tsunoda, T., Minaguchi, T., Kuramoto, H., Nishida, M., Satoh, T., Tanaka, T., and Nakamura, Y. (2001). Growth and Gene Expression Profile Analyses of Endometrial Cancer Cells Expressing Exogenous PTEN. Cancer Res. 61, 3741–3749.

Mattson, M.P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. Physiol. Rev. 77, 1081–1132.

McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. Curr. Biol. CB 16, R551-560.

McCarthy, J.V., Twomey, C., and Wujek, P. (2009). Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 66, 1534–1555.

McGowan, E., Pickford, F., Kim, J., Onstead, L., Eriksen, J., Yu, C., Skipper, L., Murphy, M.P., Beard, J., Das, P., et al. (2005). Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. Neuron 47, 191–199.

McNiven, M.A., Cao, H., Pitts, K.R., and Yoon, Y. (2000). The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. Trends Biochem. Sci. 25, 115–120.

Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. Nat. Struct. Mol. Biol. 18, 20–26.

Meckler, X., and Checler, F. (2014). Visualization of specific γ -secretase complexes using bimolecular fluorescence complementation. J. Alzheimers Dis. JAD 40, 161–176.

Meckler, X., and Checler, F. (2016). Presenilin 1 and Presenilin 2 Target γ -Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments. J. Biol. Chem. 291, 12821–12837.

Mei, Y., Zhang, Y., Yamamoto, K., Xie, W., Mak, T.W., and You, H. (2009). FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 5153–5158.

Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D.J., and Lemberg, M.K. (2011). The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. J. Neurochem. 117, 856–867.

Michiorri, S., Gelmetti, V., Giarda, E., Lombardi, F., Romano, F., Marongiu, R., Nerini-Molteni, S., Sale, P., Vago, R., Arena, G., et al. (2010). The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. Cell Death Differ. 17, 962–974.

Mikulca, J.A., Nguyen, V., Gajdosik, D.A., Teklu, S.G., Giunta, E.A., Lessa, E.A., Tran, C.H., Terak, E.C., and Raffa, R.B. (2014). Potential novel targets for Alzheimer pharmacotherapy: II. Update on secretase inhibitors and related approaches. J. Clin. Pharm. Ther. 39, 25–37.

Mills, R.D., Sim, C.H., Mok, S.S., Mulhern, T.D., Culvenor, J.G., and Cheng, H.-C. (2008). Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). J. Neurochem. 105, 18–33.

Minopoli, G., de Candia, P., Bonetti, A., Faraonio, R., Zambrano, N., and Russo, T. (2001). The beta-amyloid precursor protein functions as a cytosolic anchoring site that prevents Fe65 nuclear translocation. J. Biol. Chem. 276, 6545–6550.

Mishra, P., and Chan, D.C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15, 634–646.

Mitchell, P. (1977). A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation. FEBS Lett. 78, 1–20.

Moehlmann, T., Winkler, E., Xia, X., Edbauer, D., Murrell, J., Capell, A., Kaether, C., Zheng, H., Ghetti, B., Haass, C., et al. (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 8025–8030.

Morais, V.A., Verstreken, P., Roethig, A., Smet, J., Snellinx, A., Vanbrabant, M., Haddad, D., Frezza, C., Mandemakers, W., Vogt-Weisenhorn, D., et al. (2009). Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. EMBO Mol. Med. 1, 99–111.

Morais, V.A., Haddad, D., Craessaerts, K., De Bock, P.-J., Swerts, J., Vilain, S., Aerts, L., Overbergh, L., Grünewald, A., Seibler, P., et al. (2014). PINK1 loss-of-function mutations affect mitochondrial complex I activity via NdufA10 ubiquinone uncoupling. Science 344, 203–207.

Moreira, P.I., Siedlak, S.L., Wang, X., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Tabaton, M., Nunomura, A., Szweda, L.I., Aliev, G., Smith, M.A., et al. (2007a). Autophagocytosis of mitochondria is prominent in Alzheimer disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66, 525–532.

Moreira, P.I., Siedlak, S.L., Wang, X., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Tabaton, M., Nunomura, A., Szweda, L.I., Aliev, G., Smith, M.A., et al. (2007b). Increased autophagic degradation of mitochondria in Alzheimer disease. Autophagy 3, 614–615.

Morfini, G., Szebenyi, G., Elluru, R., Ratner, N., and Brady, S.T. (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. EMBO J. 21, 281–293.

Moriwaki, Y., Kim, Y.-J., Ido, Y., Misawa, H., Kawashima, K., Endo, S., and Takahashi, R. (2008). L347P PINK1 mutant that fails to bind to Hsp90/Cdc37 chaperones is rapidly degraded in a proteasome-dependent manner. Neurosci. Res. 61, 43–48.

Morrison, R.S., Kinoshita, Y., Johnson, M.D., Guo, W., and Garden, G.A. (2003). p53-dependent cell death signaling in neurons. Neurochem. Res. 28, 15–27.

Mortiboys, H., Thomas, K.J., Koopman, W.J.H., Klaffke, S., Abou-Sleiman, P., Olpin, S., Wood, N.W., Willems, P.H.G.M., Smeitink, J.A.M., Cookson, M.R., et al. (2008). Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. Ann. Neurol. 64, 555–565.

Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., and Wooten, M.W. (2007). Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. Trends Biochem. Sci. 32, 95–100.

Müller, U.C., and Zheng, H. (2012). Physiological functions of APP family proteins. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006288.
Müller, T., Meyer, H.E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008). The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics—Relevance for Alzheimer's disease. Prog. Neurobiol. 85, 393–406.

Muqit, M.M.K., Abou-Sleiman, P.M., Saurin, A.T., Harvey, K., Gandhi, S., Deas, E., Eaton, S., Payne Smith, M.D., Venner, K., Matilla, A., et al. (2006). Altered cleavage and localization of PINK1 to aggresomes in the presence of proteasomal stress. J. Neurochem. 98, 156–169.

Nakajima, A., Kataoka, K., Hong, M., Sakaguchi, M., and Huh, N. (2003). BRPK, a novel protein kinase showing increased expression in mouse cancer cell lines with higher metastatic potential. Cancer Lett. 201, 195–201.

Nakamura, T., Cieplak, P., Cho, D.-H., Godzik, A., and Lipton, S.A. (2010). S-Nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration. Mitochondrion 10, 573–578.

Nakamura, Y., Takeda, M., Suzuki, H., Hattori, H., Tada, K., Hariguchi, S., Hashimoto, S., and Nishimura, T. (1991). Abnormal distribution of cathepsins in the brain of patients with Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 130, 195–198.

Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. FEBS Lett. 587, 2046–2054.

Nalivaeva, N.N., Belyaev, N.D., Lewis, D.I., Pickles, A.R., Makova, N.Z., Bagrova, D.I., Dubrovskaya, N.M., Plesneva, S.A., Zhuravin, I.A., and Turner, A.J. (2012). Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats. J. Mol. Neurosci. MN 46, 569–577.

Naon, D., and Scorrano, L. (2014). At the right distance: ER-mitochondria juxtaposition in cell life and death. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1843, 2184–2194.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008a). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. J. Cell Biol. 183, 795–803.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008b). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. J. Cell Biol. 183, 795–803.

Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. PLoS Biol. 8, e1000298.

Nemes, Z., Devreese, B., Steinert, P.M., Van Beeumen, J., and Fésüs, L. (2004). Cross-linking of ubiquitin, HSP27, parkin, and alpha-synuclein by gamma-glutamyl-epsilon-lysine bonds in Alzheimer's neurofibrillary tangles. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 18, 1135–1137.

Nemoto, S., and Finkel, T. (2002). Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. Science 295, 2450–2452.

Nieto, M.A., Huang, R.Y.-J., Jackson, R.A., and Thiery, J.P. (2016). EMT: 2016. Cell 166, 21-45.

Nixon, R.A. (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. J. Cell Sci. 120, 4081–4091.

Nixon, R.A., and Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect. Neurobiol. Dis. 43, 38–45.

Nixon, R.A., Cataldo, A.M., and Mathews, P.M. (2000). The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. Neurochem. Res. 25, 1161–1172.

Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T., et al. (2003). Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo. Neuron 38, 555–565.

Nunan, J., Shearman, M.S., Checler, F., Cappai, R., Evin, G., Beyreuther, K., Masters, C.L., and Small, D.H. (2001). The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase. Eur. J. Biochem. 268, 5329–5336.

Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I.F., Green, K.N., and LaFerla, F.M. (2006). A Dynamic Relationship between Intracellular and Extracellular Pools of Aβ. Am. J. Pathol. 168, 184–194.

O'Flanagan, C.H., and O'Neill, C. (2014). PINK1 signalling in cancer biology. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer 1846, 590–598.

O'Flanagan, C.H., Morais, V.A., Wurst, W., De Strooper, B., and O'Neill, C. (2015). The Parkinson's gene PINK1 regulates cell cycle progression and promotes cancer-associated phenotypes. Oncogene 34, 1363–1374.

Ohsawa, I., Takamura, C., Morimoto, T., Ishiguro, M., and Kohsaka, S. (1999). Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. Eur. J. Neurosci. 11, 1907–1913.

Ohyagi, Y. (2008). Intracellular amyloid beta-protein as a therapeutic target for treating Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. 5, 555–561.

Ohyagi, Y., Asahara, H., Chui, D.-H., Tsuruta, Y., Sakae, N., Miyoshi, K., Yamada, T., Kikuchi, H., Taniwaki, T., Murai, H., et al. (2005). Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 19, 255–257.

Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., et al. (2012). PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. Nat. Commun. 3, 1016.

Okatsu, K., Koyano, F., Kimura, M., Kosako, H., Saeki, Y., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2015). Phosphorylated ubiquitin chain is the genuine Parkin receptor. J. Cell Biol. 209, 111–128.

Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., et al. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. FEBS Lett. 523, 171–176.

Ordureau, A., Sarraf, S.A., Duda, D.M., Heo, J.-M., Jedrychowski, M.P., Sviderskiy, V.O., Olszewski, J.L., Koerber, J.T., Xie, T., Beausoleil, S.A., et al. (2014). Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. Mol. Cell 56, 360–375.

Oren, M., and Rotter, V. (2010). Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2, a001107.

Paik, J.-H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J.W., Carrasco, D.R., et al. (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. Cell 128, 309–323.

Palacino, J.J., Berechid, B.E., Alexander, P., Eckman, C., Younkin, S., Nye, J.S., and Wolozin, B. (2000). Regulation of Amyloid Precursor Protein Processing by Presenilin 1 (PS1) and PS2 in PS1 Knockout Cells. J. Biol. Chem. 275, 215–222.

Palikaras, K., and Tavernarakis, N. (2012). Mitophagy in neurodegeneration and aging. Genet. Aging 3, 297.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. J. Biol. Chem. 282, 24131–24145.

Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2012). The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. J. Neurochem. 120 Suppl 1, 109–124.

Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Müller, U., et al. (2005). Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. Neuron 46, 541–554.

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

Park, J., Lee, G., and Chung, J. (2009). The PINK1-Parkin pathway is involved in the regulation of mitochondrial remodeling process. Biochem. Biophys. Res. Commun. 378, 518–523.

Park, J.-S., Kim, D.-H., and Yoon, S.-Y. (2016). Regulation of amyloid precursor protein processing by its KFERQ motif. BMB Rep. 49, 337–342.

Parker, W.D., Filley, C.M., and Parks, J.K. (1990). Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. Neurology 40, 1302–1302.

Parsons, R., and Simpson, L. (2003). PTEN and cancer. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 222, 147-166.

Passer, B., Pellegrini, L., Russo, C., Siegel, R.M., Lenardo, M.J., Schettini, G., Bachmann, M., Tabaton, M., and D'Adamio, L. (2000). Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor. J. Alzheimers Dis. JAD 2, 289–301.

Pasternak, S.H., Bagshaw, R.D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C.A., Pak, B.J., Callahan, J.W., and Mahuran, D.J. (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. J. Biol. Chem. 278, 26687–26694.

Peric, A., and Annaert, W. (2015). Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? Acta Neuropathol. (Berl.) 129, 363–381.

Petit, A., Bihel, F., Alvès da Costa, C., Pourquié, O., Checler, F., and Kraus, J.L. (2001). New protease inhibitors prevent gamma-secretase-mediated production of Abeta40/42 without affecting Notch cleavage. Nat. Cell Biol. 3, 507–511.

Petit, A., Kawarai, T., Paitel, E., Sanjo, N., Maj, M., Scheid, M., Chen, F., Gu, Y., Hasegawa, H., Salehi-Rad, S., et al. (2005). Wild-type PINK1 Prevents Basal and Induced Neuronal Apoptosis, a Protective Effect Abrogated by Parkinson Disease-related Mutations. J. Biol. Chem. 280, 34025–34032.

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum. Mutat. 28, 622–629.

Piccoli, C., Sardanelli, A., Scrima, R., Ripoli, M., Quarato, G., D'Aprile, A., Bellomo, F., Scacco, S., De Michele, G., Filla, A., et al. (2008). Mitochondrial respiratory dysfunction in familiar parkinsonism associated with PINK1 mutation. Neurochem. Res. 33, 2565–2574.

Pilsl, A., and Winklhofer, K.F. (2011). Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Acta Neuropathol. (Berl.) 123, 173–188.

Pinho, C.M., Teixeira, P.F., and Glaser, E. (2014). Mitochondrial import and degradation of amyloid-β peptide. Biochim. Biophys. Acta 1837, 1069–1074.

Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., and Pearson, H.A. (2003). The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 23, 5531–5535.

Plun-Favreau, H., Klupsch, K., Moisoi, N., Gandhi, S., Kjaer, S., Frith, D., Harvey, K., Deas, E., Harvey, R.J., McDonald, N., et al. (2007). The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. Nat. Cell Biol. 9, 1243–1252.

Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., and Fuller, F. (1988). A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. Nature 331, 525–527.

Poole, A.C., Thomas, R.E., Andrews, L.A., McBride, H.M., Whitworth, A.J., and Pallanck, L.J. (2008). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 1638–1643.

Poole, A.C., Thomas, R.E., Yu, S., Vincow, E.S., and Pallanck, L. (2010). The Mitochondrial Fusion-Promoting Factor Mitofusin Is a Substrate of the PINK1/Parkin Pathway. PLOS ONE 5, e10054.

Popescu, B. o., and Ankarcrona, M. (2000). Neurons bearing presenilins: weapons for defense or suicide? J. Cell. Mol. Med. 4, 249–261.

Pridgeon, J.W., Olzmann, J.A., Chin, L.-S., and Li, L. (2007). PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. PLoS Biol. 5, e172.

Pugh, T.J., Morozova, O., Attiyeh, E.F., Asgharzadeh, S., Wei, J.S., Auclair, D., Carter, S.L., Cibulskis, K., Hanna, M., Kiezun, A., et al. (2013). The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. Nat. Genet. 45, 279–284.

Puig, B., Gómez-Isla, T., Ribé, E., Cuadrado, M., Torrejón-Escribano, B., Dalfó, E., and Ferrer, I. (2004). Expression of stress-activated kinases c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK-P) and p38 kinase (p38-P), and tau hyperphosphorylation in neurites surrounding β A plaques in APP Tg2576 mice. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 30, 491–502.

Qin, W., Haroutunian, V., Katsel, P., Cardozo, C.P., Ho, L., Buxbaum, J.D., and Pasinetti, G.M. (2009). PGC-1a Expression Decreases in the Alzheimer Disease Brain as a Function of Dementia. Arch. Neurol. 66, 352–361.

Qing, H., He, G., Ly, P.T.T., Fox, C.J., Staufenbiel, M., Cai, F., Zhang, Z., Wei, S., Sun, X., Chen, C.-H., et al. (2008). Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. J. Exp. Med. 205, 2781–2789.

Ralph A. Nixon, Paul M. Mathews, and Anne M. Cataldo (2001). The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. 3, 97–107.

Reddy, P.H. (2009). Amyloid Beta, Mitochondrial Structural, and Functional Dynamics in Alzheimer's Disease. Exp. Neurol. 218, 286–292.

Reddy, P.H. (2011). Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. Brain Res. 1415, 136–148.

Rehman, J., Zhang, H.J., Toth, P.T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A.N., Wietholt, C., and Archer, S.L. (2012). Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 26, 2175–2186.

Reinhard, C., Hébert, S.S., and De Strooper, B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. EMBO J. 24, 3996–4006.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., and Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic. Biol. Med. 49, 1603–1616.

Rhein, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L.M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Dröse, S., Brandt, U., et al. (2009). Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 20057–20062.

Ribe, E.M., Serrano-Saiz, E., Akpan, N., and Troy, C.M. (2008). Mechanisms of neuronal death in disease: defining the models and the players. Biochem. J. 415, 165–182.

Rickle, A., Bogdanovic, N., Volkmann, I., Zhou, X., Pei, J.-J., Winblad, B., and Cowburn, R.F. (2006). PTEN levels in Alzheimer's disease medial temporal cortex. Neurochem. Int. 48, 114–123.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 402–412.

Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C.B., Korte, M., et al. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 27, 7817–7826.

Rodríguez-Navarro, J.A., Casarejos, M.J., Menéndez, J., Solano, R.M., Rodal, I., Gómez, A., Yébenes, J.G. de, and Mena, M.A. (2007). Mortality, oxidative stress and tau accumulation during ageing in parkin null mice. J. Neurochem. 103, 98–114.

Rodríguez-Navarro, J.A., Gómez, A., Rodal, I., Perucho, J., Martinez, A., Furió, V., Ampuero, I., Casarejos, M.J., Solano, R.M., de Yébenes, J.G., et al. (2008). Parkin deletion causes cerebral and systemic amyloidosis in human mutated tau over-expressing mice. Hum. Mol. Genet. 17, 3128–3143.

Rogaev, E.I., Sherrington, R., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., and Tsuda, T. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. Nature 376, 775–778.

Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombès, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. J. Cell Sci. 115, 1663–1674.

Rosen, K.M., Veereshwarayya, V., Moussa, C.E.-H., Fu, Q., Goldberg, M.S., Schlossmacher, M.G., Shen, J., and Querfurth, H.W. (2006). Parkin protects against mitochondrial toxins and beta-amyloid accumulation in skeletal muscle cells. J. Biol. Chem. 281, 12809–12816.

Rosen, K.M., Moussa, C.E.-H., Lee, H.-K., Kumar, P., Kitada, T., Qin, G., Fu, Q., and Querfurth, H.W. (2010). Parkin reverses intracellular beta-amyloid accumulation and its negative effects on proteasome function. J. Neurosci. Res. 88, 167–178.

Rosenfeldt, M.T., and Ryan, K.M. (2009). The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. Expert Rev. Mol. Med. 11, e36.

Rotz, R.C. von, Kohli, B.M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R.M., and Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. J. Cell Sci. 117, 4435–4448.

Rubinsztein, D.C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 11, 709–730.

Rui, Y., Tiwari, P., Xie, Z., and Zheng, J.Q. (2006). Acute impairment of mitochondrial trafficking by betaamyloid peptides in hippocampal neurons. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 26, 10480–10487.

Russo, C., Salis, S., Dolcini, V., Venezia, V., Song, X.H., Teller, J.K., and Schettini, G. (2001). Amino-terminal modification and tyrosine phosphorylation of [corrected] carboxy-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain. Neurobiol. Dis. 8, 173–180.

Russo, R., Borghi, R., Markesbery, W., Tabaton, M., and Piccini, A. (2005). Neprylisin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. FEBS Lett. 579, 6027–6030.

Sämann, J., Hegermann, J., von Gromoff, E., Eimer, S., Baumeister, R., and Schmidt, E. (2009). Caenorhabditits elegans LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. J. Biol. Chem. 284, 16482–16491.

Sánchez, M.P., Gonzalo, I., Avila, J., and De Yébenes, J.G. (2002). Progressive supranuclear palsy and tau hyperphosphorylation in a patient with a C212Y parkin mutation. J. Alzheimers Dis. JAD 4, 399–404.

Sandbrink, R., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1994). Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. J. Biol. Chem. 269, 1510–1517.

Sandebring, A., Thomas, K.J., Beilina, A., van der Brug, M., Cleland, M.M., Ahmad, R., Miller, D.W., Zambrano, I., Cowburn, R.F., Behbahani, H., et al. (2009). Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1. PloS One 4, e5701.

Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., Veerle, B., Coen, K., Munck, S., Strooper, B.D., et al. (2011). ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, E559–E568.

Sanphui, P., and Biswas, S.C. (2013). FoxO3a is activated and executes neuron death via Bim in response to β -amyloid. Cell Death Dis. 4, e625.

Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. J. Cell Sci. 114, 867–874.

Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condron, M.M., Teplow, D.B., and Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. EMBO Rep. 2, 835–841.

Sato, T., Dohmae, N., Qi, Y., Kakuda, N., Misonou, H., Mitsumori, R., Maruyama, H., Koo, E.H., Haass, C., Takio, K., et al. (2003). Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein. J. Biol. Chem. 278, 24294–24301.

Sato, T., Diehl, T.S., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., and Wolfe, M.S. (2007). Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. J. Biol. Chem. 282, 33985–33993.

Savage, M.J., Trusko, S.P., Howland, D.S., Pinsker, L.R., Mistretta, S., Reaume, A.G., Greenberg, B.D., Siman, R., and Scott, R.W. (1998). Turnover of amyloid beta-protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 18, 1743–1752.

Schaeffer, V., Lavenir, I., Ozcelik, S., Tolnay, M., Winkler, D.T., and Goedert, M. (2012). Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. Brain 135, 2169–2177.

Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet Lond. Engl. 1, 1269.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. EMBO J. 26, 1749–1760.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9, 671–675.

Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med. 8, 595-608.

Senechal, Y., Kelly, P.H., and Dev, K.K. (2008). Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. Behav. Brain Res. 186, 126–132.

Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L.O., Winblad, B., and Benedikz, E. (2000). Levels of alphaand beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. Neurosci. Lett. 278, 169–172.

Serrano, R., Kanner, B.I., and Racker, E. (1976). Purification and properties of the proton-translocating adenosine triphosphatase complex of bovine heart mitochondria. J. Biol. Chem. 251, 2453–2461.

Sha, D., Chin, L.-S., and Li, L. (2010). Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF- κ B signaling. Hum. Mol. Genet. 19, 352–363.

Shaerzadeh, F., Motamedi, F., Minai-Tehrani, D., and Khodagholi, F. (2014). Monitoring of neuronal loss in the hippocampus of A β -injected rat: autophagy, mitophagy, and mitochondrial biogenesis stand against apoptosis. Neuromolecular Med. 16, 175–190.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature 375, 754–760.

Shi, G., Lee, J.R., Grimes, D.A., Racacho, L., Ye, D., Yang, H., Ross, O.A., Farrer, M., McQuibban, G.A., and Bulman, D.E. (2011). Functional alteration of PARL contributes to mitochondrial dysregulation in Parkinson's disease. Hum. Mol. Genet. 20, 1966–1974.

Shiba-Fukushima, K., Arano, T., Matsumoto, G., Inoshita, T., Yoshida, S., Ishihama, Y., Ryu, K.-Y., Nukina, N., Hattori, N., and Imai, Y. (2014). Phosphorylation of mitochondrial polyubiquitin by PINK1 promotes Parkin mitochondrial tethering. PLoS Genet. 10, e1004861.

Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. J. Clin. Invest. 106, 1489–1499.

Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V., Masteller, E.L., D'Adamio, L., Hersh, L.B., and Reinherz, E.L. (1989). Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86, 297–301.

Shlevkov, E., Kramer, T., Schapansky, J., LaVoie, M.J., and Schwarz, T.L. (2016). Miro phosphorylation sites regulate Parkin recruitment and mitochondrial motility. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.

Siddall, H.K., Warrell, C.E., Davidson, S.M., Mocanu, M.M., and Yellon, D.M. (2008). Mitochondrial PINK1--a novel cardioprotective kinase? Cardiovasc. Drugs Ther. 22, 507–508.

Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M., and Casari, G. (2005). Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. Hum. Mol. Genet. 14, 3477–3492.

Sj, P., and H, L. (2005). Secretase inhibitors for Alzheimer's disease: challenges of a promiscuous protease. Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl. 2000 6, 35–47.

Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.-G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., et al. (1999). Ordering the Cytochrome c-initiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase-9–dependent Manner. J. Cell Biol. 144, 281–292.

Small, S.A., and Gandy, S. (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. Neuron 52, 15–31.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. Mol. Biol. Cell 12, 2245–2256.

Son, J.H., Shim, J.H., Kim, K.H., Ha, J.Y., and Han, J.Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. Exp. Mol. Med. 44, 89–98.

Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., and Chan, D.C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. J. Cell Biol. 178, 749–755.

Sonoda, Y., Mukai, H., Matsuo, K., Takahashi, M., Ono, Y., Maeda, K., Akiyama, H., and Kawamata, T. (2010). Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. Neurosci. Lett. 471, 20–24.

Soussi, T., and Wiman, K.G. (2007). Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. Cancer Cell 12, 303–312.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M.-Y., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). α-Synuclein in Lewy bodies. Nature 388, 839–840.

St George-Hyslop, P., and Fraser, P.E. (2012). Assembly of the presenilin γ -/ ϵ -secretase complex. J. Neurochem. 120, 84–88.

Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S., et al. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Science 307, 1282–1288.

Stolz, A., and Dikic, I. (2014). PINK1-PARKIN interplay: down to ubiquitin phosphorylation. Mol. Cell 56, 341–342.

Storz, P., Döppler, H., Copland, J.A., Simpson, K.J., and Toker, A. (2009). FOXO3a promotes tumor cell invasion through the induction of matrix metalloproteinases. Mol. Cell. Biol. 29, 4906–4917.

Su, B., Wang, X., Zheng, L., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2010a). Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. Biochim. Biophys. Acta 1802, 135–142.

Su, B., Wang, X., Bonda, D., Perry, G., Smith, M., and Zhu, X. (2010b). Abnormal mitochondrial dynamics--a novel therapeutic target for Alzheimer's disease? Mol. Neurobiol. 41, 87–96.

Su, J.-L., Cheng, X., Yamaguchi, H., Chang, Y.-W., Hou, C.-F., Lee, D.-F., Ko, H.-W., Hua, K.-T., Wang, Y.-N., Hsiao, M., et al. (2011). FOXO3a-Dependent Mechanism of E1A-Induced Chemosensitization. Cancer Res. 71, 6878–6887.

Suh, Y.-H., and Checler, F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. Pharmacol. Rev. 54, 469–525.

Sui, X., Jin, L., Huang, X., Geng, S., He, C., and Hu, X. (2011). p53 signaling and autophagy in cancer: A revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. Autophagy 7, 565–571.

Sun, B., Zhou, Y., Halabisky, B., Lo, I., Cho, S.-H., Mueller-Steiner, S., Devidze, N., Wang, X., Grubb, A., and Gan, L. (2008). Cystatin C-Cathepsin B Axis Regulates Amyloid Beta Levels and Associated Neuronal Deficits in an Animal Model of Alzheimer's Disease. Neuron 60, 247–257.

Sunico, C.R., Nakamura, T., Rockenstein, E., Mante, M., Adame, A., Chan, S.F., Newmeyer, T.F., Masliah, E., Nakanishi, N., and Lipton, S.A. (2013). S-Nitrosylation of parkin as a novel regulator of p53-mediated neuronal cell death in sporadic Parkinson's disease. Mol. Neurodegener. 8, 29.

Sunters, A., Fernández de Mattos, S., Stahl, M., Brosens, J.J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C.A., Coffer, P.J., Medema, R.H., Coombes, R.C., and Lam, E.W.-F. (2003). FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines. J. Biol. Chem. 278, 49795–49805.

Suzuki, T., and Nakaya, T. (2008). Regulation of amyloid beta-protein precursor by phosphorylation and protein interactions. J. Biol. Chem. 283, 29633–29637.

Svensson, J.P., Fry, R.C., Wang, E., Somoza, L.A., and Samson, L.D. (2012). Identification of novel human damage response proteins targeted through yeast orthology. PloS One 7, e37368.

Swerdlow, R.H., Burns, J.M., and Khan, S.M. (2014). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis. 1842, 1219–1231.

Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. Nature 422, 438–441.

Tam, J.H.K., Seah, C., and Pasternak, S.H. (2014). The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid. Mol. Brain 7, 54.

Tang, B., Xiong, H., Sun, P., Zhang, Y., Wang, D., Hu, Z., Zhu, Z., Ma, H., Pan, Q., Xia, J.-H., et al. (2006). Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. Hum. Mol. Genet. 15, 1816–1825.

Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 445, 77-88.

Tanzi, R.E., McClatchey, A.I., Lamperti, E.D., Villa-Komaroff, L., Gusella, J.F., and Neve, R.L. (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. Nature 331, 528–530.

Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., et al. (2008a). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. Nat. Cell Biol. 10, 676–687.

Tasdemir, E., Maiuri, M.C., Morselli, E., Criollo, A., D'Amelio, M., Djavaheri-Mergny, M., Cecconi, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2008b). A dual role of p53 in the control of autophagy. Autophagy 4, 810–814.

Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W., et al. (2003). Characterization of the human heart mitochondrial proteome. Nat. Biotechnol. 21, 281–286.

Taymans, J.-M., Van den Haute, C., and Baekelandt, V. (2006). Distribution of PINK1 and LRRK2 in rat and mouse brain. J. Neurochem. 98, 951–961.

Teng, F.Y.H., and Tang, B.L. (2011). NF-κB Signaling in Neurite Growth and Neuronal Survival. Rev. Neurosci. 21, 299–314.

Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. J. Biol. Chem. 283, 29615–29619.

Tofaris, G.K., Razzaq, A., Ghetti, B., Lilley, K.S., and Spillantini, M.G. (2003). Ubiquitination of α -Synuclein in Lewy Bodies Is a Pathological Event Not Associated with Impairment of Proteasome Function. J. Biol. Chem. 278, 44405–44411.

Trempe, J.-F., and Fon, E.A. (2013). Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. Front. Neurol. 4.

Trimmer, P.A., Smith, T.S., Jung, A.B., and Bennett, J.P. (1996). Dopamine neurons from transgenic mice with a knockout of the p53 gene resist MPTP neurotoxicity. Neurodegener. J. Neurodegener. Disord. Neuroprotection Neuroregeneration 5, 233–239.

Trimmer, P.A., Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Keeney, P., Bennett Jr., J.P., Miller, S.W., Davis, R.E., and Parker Jr., W.D. (2000). Abnormal Mitochondrial Morphology in Sporadic Parkinson's and Alzheimer's Disease Cybrid Cell Lines. Exp. Neurol. 162, 37–50.

Trushina, E., Nemutlu, E., Zhang, S., Christensen, T., Camp, J., Mesa, J., Siddiqui, A., Tamura, Y., Sesaki, H., Wengenack, T.M., et al. (2012). Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer's disease. PloS One 7, e32737.

Tseng, B.P., Green, K.N., Chan, J.L., Blurton-Jones, M., and LaFerla, F.M. (2008). Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. Neurobiol. Aging 29, 1607–1618.

Tsuneki, M., Nakamura, Y., Kinjo, T., Nakanishi, R., and Arakawa, H. (2015). Mieap suppresses murine intestinal tumor via its mitochondrial quality control. Sci. Rep. 5, 12472.

Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. EMBO J. 27, 433–446.

Uhlik, M.T., Temple, B., Bencharit, S., Kimple, A.J., Siderovski, D.P., and Johnson, G.L. (2005). Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. J. Mol. Biol. 345, 1–20.

Um, J.W., Stichel-Gunkel, C., Lübbert, H., Lee, G., and Chung, K.C. (2009). Molecular interaction between parkin and PINK1 in mammalian neuronal cells. Mol. Cell. Neurosci. 40, 421–432.

Unoki, M., and Nakamura, Y. (2001). Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. Oncogene 20, 4457–4465.

Urra, S., Escudero, C.A., Ramos, P., Lisbona, F., Allende, E., Covarrubias, P., Parraguez, J.I., Zampieri, N., Chao, M.V., Annaert, W., et al. (2007). TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. J. Biol. Chem. 282, 7606–7615.

Vaccari, T., Lu, H., Kanwar, R., Fortini, M.E., and Bilder, D. (2008). Endosomal entry regulates Notch receptor activation in Drosophila melanogaster. J. Cell Biol. 180, 755–762.

Vakifahmetoglu-Norberg, H., Kim, M., Xia, H.-G., Iwanicki, M.P., Ofengeim, D., Coloff, J.L., Pan, L., Ince, T.A., Kroemer, G., Brugge, J.S., et al. (2013). Chaperone-mediated autophagy degrades mutant p53. Genes Dev. 27, 1718–1730.

Vakifahmetoglu-Norberg, H., Kim, M., Xia, H.-G., Iwanicki, M.P., Ofengeim, D., Coloff, J.L., Pan, L., Ince, T.A., Kroemer, G., Brugge, J.S., et al. (2016). Corrigendum: Chaperone-mediated autophagy degrades mutant p53. Genes Dev. 30, 870.

Valente, E.M., Bentivoglio, A.R., Dixon, P.H., Ferraris, A., Ialongo, T., Frontali, M., Albanese, A., and Wood, N.W. (2001). Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. Am. J. Hum. Genet. 68, 895–900.

Valente, E.M., Salvi, S., Ialongo, T., Marongiu, R., Elia, A.E., Caputo, V., Romito, L., Albanese, A., Dallapiccola, B., and Bentivoglio, A.R. (2004a). PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. Ann. Neurol. 56, 336–341.

Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M.K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., et al. (2004b). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. Science 304, 1158–1160.

Vanacore, N., Spila-Alegiani, S., Raschetti, R., and Meco, G. (1999). Mortality cancer risk in parkinsonian patients: a population-based study. Neurology 52, 395–398.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. Science 286, 735–741.

Veeriah, S., Taylor, B.S., Meng, S., Fang, F., Yilmaz, E., Vivanco, I., Janakiraman, M., Schultz, N., Hanrahan, A.J., Pao, W., et al. (2010). Somatic mutations of the Parkinson's disease-associated gene PARK2 in glioblastoma and other human malignancies. Nat. Genet. 42, 77–82.

Verdile, G., Martins, R.N., Duthie, M., Holmes, E., St George-Hyslop, P.H., and Fraser, P.E. (2000). Inhibiting amyloid precursor protein C-terminal cleavage promotes an interaction with presenilin 1. J. Biol. Chem. 275, 20794–20798.

Vingtdeux, V., Hamdane, M., Bégard, S., Loyens, A., Delacourte, A., Beauvillain, J.-C., Buée, L., Marambaud, P., and Sergeant, N. (2007). Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. Neurobiol. Dis. 25, 686–696.

Viotti, J., Duplan, E., Caillava, C., Condat, J., Goiran, T., Giordano, C., Marie, Y., Idbaih, A., Delattre, J.-Y., Honnorat, J., et al. (2014). Glioma tumor grade correlates with parkin depletion in mutant p53-linked tumors and results from loss of function of p53 transcriptional activity. Oncogene 33, 1764–1775.

Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L.A., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., et al. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 378–383.

Vogt, D.L., Thomas, D., Galvan, V., Bredesen, D.E., Lamb, B.T., and Pimplikar, S.W. (2011). Abnormal neuronal networks and seizure susceptibility in mice overexpressing the APP intracellular domain. Neurobiol. Aging 32, 1725–1729.

Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., and Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. J. Cell Biol. 186, 805–816.

Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annu. Rev. Genet. 39, 359–407.

Walter, J., Fluhrer, R., Hartung, B., Willem, M., Kaether, C., Capell, A., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2001). Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase. J. Biol. Chem. 276, 14634–14641.

Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The mechanism of Ca2+ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. Cell 136, 163–174.

Wang, D., Qian, L., Xiong, H., Liu, J., Neckameyer, W.S., Oldham, S., Xia, K., Wang, J., Bodmer, R., and Zhang, Z. (2006a). Antioxidants protect PINK1-dependent dopaminergic neurons in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 13520–13525.

Wang, D.B., Garden, G.A., Kinoshita, C., Wyles, C., Babazadeh, N., Sopher, B., Kinoshita, Y., and Morrison, R.S. (2013). Declines in Drp1 and parkin expression underlie DNA damage-induced changes in mitochondrial length and neuronal death. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 1357–1365.

Wang, D.-S., Dickson, D.W., and Malter, J.S. (2006b). beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. J. Biomed. Biotechnol. 2006, 58406.

Wang, H., Song, P., Du, L., Tian, W., Yue, W., Liu, M., Li, D., Wang, B., Zhu, Y., Cao, C., et al. (2011a). Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. J. Biol. Chem. 286, 11649–11658.

Wang, H.-L., Chou, A.-H., Yeh, T.-H., Li, A.H., Chen, Y.-L., Kuo, Y.-L., Tsai, S.-R., and Yu, S.-T. (2007). PINK1 mutants associated with recessive Parkinson's disease are defective in inhibiting mitochondrial release of cytochrome c. Neurobiol. Dis. 28, 216–226.

Wang, J.-X., Jiao, J.-Q., Li, Q., Long, B., Wang, K., Liu, J.-P., Li, Y.-R., and Li, P.-F. (2011b). miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. Nat. Med. 17, 71–78.

Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., and Zhu, X. (2008a). Amyloid- β overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 19318–19323.

Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., and Zhu, X. (2008b). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 19318–19323.

Wang, X., Su, B., Fujioka, H., and Zhu, X. (2008c). Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. Am. J. Pathol. 173, 470–482.

Wang, X., Su, B., Lee, H., Li, X., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 29, 9090–9103.

Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y.L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M.J., and Schwarz, T.L. (2011c). PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. Cell 147, 893–906.

Wang, X., Wang, Z., Chen, Y., Huang, X., Hu, Y., Zhang, R., Ho, M.S., and Xue, L. (2014). FoxO mediates APP-induced AICD-dependent cell death. Cell Death Dis. 5, e1233.

Wang, X., Zhao, X.-L., Xu, L.-L., Wang, C.-F., Wei, L.-F., Liu, Z., Yang, H., Wang, P., Xie, Z.-H., and Bi, J.-Z. (2015). Mitophagy in APPsw/PS1dE9 transgenic mice and APPsw stably expressing in HEK293 cells. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 19, 4595–4602.

van de Warrenburg, B.P., Lammens, M., Lücking, C.B., Denèfle, P., Wesseling, P., Booij, J., Praamstra, P., Quinn, N., Brice, A., and Horstink, M.W. (2001). Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. Neurology 56, 555–557.

Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B.M., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. Biochemistry (Mosc.) 41, 2825–2835.

Weihofen, A., Ostaszewski, B., Minami, Y., and Selkoe, D.J. (2008). Pink1 Parkinson mutations, the Cdc37/Hsp90 chaperones and Parkin all influence the maturation or subcellular distribution of Pink1. Hum. Mol. Genet. 17, 602–616.

Weihofen, A., Thomas, K.J., Ostaszewski, B.L., Cookson, M.R., and Selkoe, D.J. (2009). Pink1 Forms a Multiprotein Complex with Miro and Milton, Linking Pink1 Function to Mitochondrial Trafficking. Biochemistry (Mosc.) 48, 2045–2052.

Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. J. Biol. Chem. 283, 13501–13505.

Weyer, S.W., Zagrebelsky, M., Herrmann, U., Hick, M., Ganss, L., Gobbert, J., Gruber, M., Altmann, C., Korte, M., Deller, T., et al. (2014). Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APPsα expression. Acta Neuropathol. Commun. 2, 36.

White, E. (2015). The role for autophagy in cancer. J. Clin. Invest. 125, 42-46.

Wiemerslage, L., and Lee, D. (2016). Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters. J. Neurosci. Methods 262, 56–65.

Wiley, J.C., Smith, E.A., Hudson, M.P., Ladiges, W.C., and Bothwell, M. (2007). Fe65 stimulates proteolytic liberation of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain. J. Biol. Chem. 282, 33313–33325.

Wilhelmus, M.M.M., van der Pol, S.M.A., Jansen, Q., Witte, M.E., van der Valk, P., Rozemuller, A.J.M., Drukarch, B., de Vries, H.E., and Van Horssen, J. (2011). Association of Parkinson disease-related protein PINK1 with Alzheimer disease and multiple sclerosis brain lesions. Free Radic. Biol. Med. 50, 469–476.

Wilkinson, S., and Ryan, K.M. (2010). Autophagy: an adaptable modifier of tumourigenesis. Curr. Opin. Genet. Dev. 20, 57–64.

Wilson, C.A., Doms, R.W., Zheng, H., and Lee, V.M.-Y. (2002). Presenilins are not required for A beta 42 production in the early secretory pathway. Nat. Neurosci. 5, 849–855.

Wilson, C.A., Murphy, D.D., Giasson, B.I., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2004). Degradative organelles containing mislocalized alpha-and beta-synuclein proliferate in presenilin-1 null neurons. J. Cell Biol. 165, 335–346.

Wirths, O., Multhaup, G., Czech, C., Feldmann, N., Blanchard, V., Tremp, G., Beyreuther, K., Pradier, L., and Bayer, T.A. (2002). Intraneuronal APP/A beta trafficking and plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenic mice. Brain Pathol. Zurich Switz. 12, 275–286.

Witte, M.E., Bol, J.G.J.M., Gerritsen, W.H., van der Valk, P., Drukarch, B., van Horssen, J., and Wilhelmus, M.M.M. (2009). Parkinson's disease-associated parkin colocalizes with Alzheimer's disease and multiple sclerosis brain lesions. Neurobiol. Dis. 36, 445–452.

Wolfe, M.S. (2012). γ-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease. J. Neurochem. 120, 89–98.

Wolfe, M.S., and Haass, C. (2001). The Role of presenilins in gamma-secretase activity. J. Biol. Chem. 276, 5413–5416.

Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., and Selkoe, D.J. (1999). Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. Nature 398, 513–517.

Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z., Abramov, A.S.Y., Miljan, E.A., Keen, G., Stanyer, L., Hargreaves, I., Klupsch, K., Deas, E., et al. (2008). PINK1 Is Necessary for Long Term Survival and Mitochondrial Function in Human Dopaminergic Neurons. PLOS ONE 3, e2455.

Wu, D.-C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., and Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 6145–6150.

Xie, H., Guan, J., Borrelli, L.A., Xu, J., Serrano-Pozo, A., and Bacskai, B.J. (2013). Mitochondrial alterations near amyloid plaques in an Alzheimer's disease mouse model. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 33, 17042–17051.

Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Choo, Y.S., Ma, H., Tang, C., Xia, K., Jiang, W., Ronai, Z. 'ev, Zhuang, X., et al. (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. J. Clin. Invest. 119, 650–660.

Xu, X., Zhou, H., and Boyer, T.G. (2011). Mediator is a transducer of amyloid-precursor-protein-dependent nuclear signalling. EMBO Rep. 12, 216–222.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature 445, 656–660.

Yaffe, M.P., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2003). Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 11424–11428.

Yamano, K., and Youle, R.J. (2013). PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. Autophagy 9, 1758–1769.

Yan, J., Liu, X.-H., Han, M.-Z., Wang, Y.-M., Sun, X.-L., Yu, N., Li, T., Su, B., and Chen, Z.-Y. (2015). Blockage of GSK3β-mediated Drp1 phosphorylation provides neuroprotection in neuronal and mouse models of Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 36, 211–227.

Yan, M.H., Wang, X., and Zhu, X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. Free Radic. Biol. Med. 62, 90–101.

Yang, A., Rajeshkumar, N.V., Wang, X., Yabuuchi, S., Alexander, B.M., Chu, G.C., Von Hoff, D.D., Maitra, A., and Kimmelman, A.C. (2014). Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. Cancer Discov. 4, 905–913.

Yang, D.-S., Kumar, A., Stavrides, P., Peterson, J., Peterhoff, C.M., Pawlik, M., Levy, E., Cataldo, A.M., and Nixon, R.A. (2008a). Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 173, 665–681.

Yang, D.-S., Stavrides, P., Mohan, P.S., Kaushik, S., Kumar, A., Ohno, M., Schmidt, S.D., Wesson, D.W., Bandyopadhyay, U., Jiang, Y., et al. (2011a). Therapeutic effects of remediating autophagy failure in a mouse model of Alzheimer disease by enhancing lysosomal proteolysis. Autophagy 7, 788–789.

Yang, D.-S., Stavrides, P., Mohan, P.S., Kaushik, S., Kumar, A., Ohno, M., Schmidt, S.D., Wesson, D., Bandyopadhyay, U., Jiang, Y., et al. (2011b). Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. Brain J. Neurol. 134, 258–277.

Yang, G., Gong, Y.-D., Gong, K., Jiang, W.-L., Kwon, E., Wang, P., Zheng, H., Zhang, X.-F., Gan, W.-B., and Zhao, N.-M. (2005). Reduced synaptic vesicle density and active zone size in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. Neurosci. Lett. 384, 66–71.

Yang, Y., Gehrke, S., Imai, Y., Huang, Z., Ouyang, Y., Wang, J.-W., Yang, L., Beal, M.F., Vogel, H., and Lu, B. (2006). Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. Proc. Natl. Acad. Sci. 103, 10793–10798.

Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H., and Lu, B. (2008b). Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 7070–7075.

Yin, Y., and Shen, W.H. (2008). PTEN: a new guardian of the genome. Oncogene 27, 5443-5453.

Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. Gene 87, 257–263.

Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Dev. 23, 798–803.

Yu, C., Kim, S.H., Ikeuchi, T., Xu, H., Gasparini, L., Wang, R., and Sisodia, S.S. (2001). Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains. J. Biol. Chem. 276, 43756–43760.

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., et al. (2000). Nicastrin modulates presentilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. Nature 407, 48–54.

Yu, W., Sun, Y., Guo, S., and Lu, B. (2011). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. Hum. Mol. Genet. 20, 3227–3240.

Yu, W.H., Kumar, A., Peterhoff, C., Shapiro Kulnane, L., Uchiyama, Y., Lamb, B.T., Cuervo, A.M., and Nixon, R.A. (2004). Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for β -amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 36, 2531–2540.

Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.-H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., et al. (2005). Macroautophagy—a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. J. Cell Biol. 171, 87–98.

Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Heid, H., Schnoelzer, M., Kenner, L., Kleinert, R., Prinz, M., Aguzzi, A., and Denk, H. (2002). p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. Am. J. Pathol. 160, 255–263.

Zeitelhofer, M., Vessey, J.P., Thomas, S., Kiebler, M., and Dahm, R. (2009). Transfection of cultured primary neurons via nucleofection. Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 4, Unit4.32.

Zeng, L., Hu, C., Zhang, F., Xu, D.C., Cui, M.-Z., and Xu, X. (2015). FLIP and PSAP Mediate Presenilin 1induced γ -secretase dependent and independent apoptosis respectively. J. Biol. Chem. jbc.M115.640177.

Zhang, H., Liu, R., Wang, R., Hong, S., Xu, H., and Zhang, Y. (2008a). Presenilins regulate the cellular level of the tumor suppressor PTEN. Neurobiol. Aging 29, 653–660.

Zhang, J., Li, X., Mueller, M., Wang, Y., Zong, C., Deng, N., Vondriska, T.M., Liem, D.A., Yang, J.-I., Korge, P., et al. (2008b). Systematic characterization of the murine mitochondrial proteome using functionally validated cardiac mitochondria. PROTEOMICS 8, 1564–1575.

Zhang, X., Li, F., Bulloj, A., Zhang, Y.-W., Tong, G., Zhang, Z., Liao, F.-F., and Xu, H. (2006). Tumorsuppressor PTEN affects tau phosphorylation, aggregation, and binding to microtubules. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 20, 1272–1274.

Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011a). APP processing in Alzheimer's disease. Mol. Brain 4, 3.

Zhang, Y., Gan, B., Liu, D., and Paik, J. (2011b). FoxO family members in cancer. Cancer Biol. Ther. 12, 253–259.

Zhang, Z., Lee, C.-H., Mandiyan, V., Borg, J.-P., Margolis, B., Schlessinger, J., and Kuriyan, J. (1997). Sequence-specific recognition of the internalization motif of the Alzheimer's amyloid precursor protein by the X11 PTB domain. EMBO J. 16, 6141–6150.

Zhao, X.-L., Wang, W.-A., Tan, J.-X., Huang, J.-K., Zhang, X., Zhang, B.-Z., Wang, Y.-H., YangCheng, H.-Y., Zhu, H.-L., Sun, X.-J., et al. (2010). Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in Drosophila. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 30, 1512–1522.

Zheng, H., and Koo, E.H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. Mol. Neurodegener. 1, 5.

Zheng, H., and Koo, E.H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. Mol. Neurodegener. 6, 27.

Zhou, J., and Parada, L.F. (2012). PTEN signaling in autism spectrum disorders. Curr. Opin. Neurobiol. 22, 873–879.

Zhou, X.-F., and Wang, Y.-J. (2011). The p75NTR extracellular domain: a potential molecule regulating the solubility and removal of amyloid- β . Prion 5, 161–163.

Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., Dauer, W., Schon, E.A., and Przedborski, S. (2008a). The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 12022–12027.

Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., Dauer, W., Schon, E.A., and Przedborski, S. (2008b). The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 12022–12027.

Zhou, H., Falkenburger, B.H., Schulz, J.B., Tieu, K., Xu, Z., and Xia, X.G. (2007). Silencing of the Pink1 gene expression by conditional RNAi does not induce dopaminergic neuron death in mice. Int. J. Biol. Sci. 3, 242–250.

Zhuravin, I.A., Dubrovskaya, N.M., Vasilev, D.S., Tumanova, N.L., and Nalivaeva, N.N. (2011). Epigenetic and pharmacological regulation of the amyloid-degrading enzyme neprilysin results in modulation of cognitive functions in mammals. Dokl. Biol. Sci. Proc. Acad. Sci. USSR Biol. Sci. Sect. 438, 145–148.

Ziviani, E., and Whitworth, A.J. (2010). How could Parkin-mediated ubiquitination of mitofusin promote mitophagy? Autophagy 6, 660–662.

Ziviani, E., Tao, R.N., and Whitworth, A.J. (2010). Drosophila Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin. Proc. Natl. Acad. Sci. 107, 5018–5023.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. elegans CED-4, Participates in Cytochrome c–Dependent Activation of Caspase-3. Cell 90, 405–413.