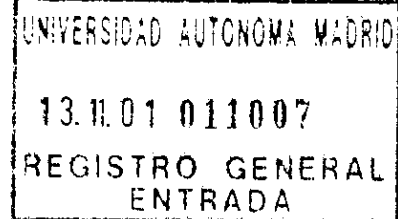


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



PROTEASOMA 20S Y NEURODEGENERACIÓN.
PAPEL COMO PROTEASA EN SINUCLEINOPATÍAS Y COMO
AUTOANTÍGENO EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

MARÍA ISABEL MAYO MELCHOR

Madrid, 2001

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de SOBRESALIENTE CUM LAUDE
Madrid, 18 DICIEMBRE 2001

[Signature]

[Signature]

J. A. L.

[Signature]

[Signature]

M
TESIS
2308

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**PROTEASOMA 20S Y NEURODEGENERACIÓN.
PAPEL COMO PROTEASA EN SINUCLEINOPATÍAS Y
COMO AUTOANTÍGENO EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE.**

Memoria de la tesis para optar al grado de doctor
presentada por la licenciada en Ciencias Biológicas

M^a ISABEL MAYO MELCHOR

Res. F. U. 21. 319

Director de la tesis:

Dr. JOSÉ GONZALEZ CASTAÑO

Catedrático de Bioquímica
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

U.A.M. – C.S.I.C.

D. José González Castaño, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Bioquímica e la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

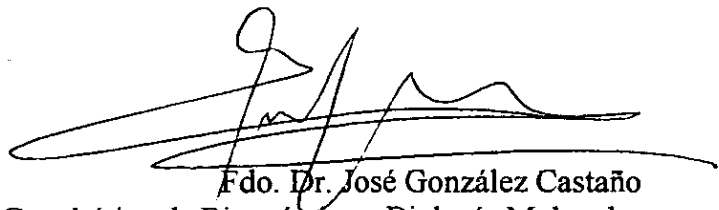
CERTIFICA

Que el trabajo presentado por la Lda. María Isabel Mayo Melchor " Proteasoma y neurodegeneración. Papel como proteasa en sinucleinopatías y como autoantígeno en Esclerosis Múltiple" para optar al grado de doctor, ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" bajo mi dirección.

En mi opinión el trabajo experimental presentado en esta tesis es original y relevante en el área de investigación básica orientada a la comprensión a nivel molecular de las patologías neurodegenerativas

Por tanto creo que reúne las condiciones necesarias para que la Lda. María Isabel Mayo Melchor pueda optar al grado de Doctor.

Firmo el presente certificado en Madrid a trece de Noviembre de dos mil uno



Fdo. Dr. José González Castaño
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular
Departamento de Bioquímica e
Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"
Facultad de Medicina de la UAM
Madrid

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica U.A.M. y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", gracias a una beca de la II Convocatoria de Ayudas de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas de la Fundación La Caixa y con subvención de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología SAF-99-0056.

*A mis padres
y a mis hermanos*

A Alejandro

*“La verdadera ciencia enseña
por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”*

Miguel de Unamuno

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todos cuantos han hecho posible este trabajo. Ante todo al Dr. José Gonzalez Castaño que me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio y sobre todo por el apoyo y ayuda que he tenido en todo momento. Gracias

A mis compañeros de laboratorio con los que he compartido tantas y tantas horas, Susana y Joaquín. Hemos compartido momentos de trabajo duros y hemos sido cómplices en la lucha por conseguir nuestros objetivos, al final lo hemos conseguido. Agradezco a Joaquín Oliva todo el trabajo aportado a esta tesis.

Quiero agradecer al Dr. Francesc Grauss del Servicio de Neurología del Hospital Clínico de Barcelona y al Dr. Xavier Montalban, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona el facilitarnos sueros de pacientes de EM y también al Dr. W.W. Tourtelotte del National Neurological Specimen Bank, Veterans Administration Medical Center, Los Angeles, USA, por las muestras suministradas de pacientes de EM de USA. Especialmente agradezco al Dr. Pablo Díaz Villoslada, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, su gran disponibilidad a lo largo de todo este tiempo y por realizar los ensayos de proliferación presentados en este trabajo.

Agradezco al Dr. Joaquín Arribas el trabajo inicial de rastreo con autoanticuerpos en EM presentado en este trabajo.

Gracias a la Dr. Rosa Sagarra compañera y también amiga por la bondad y apoyo que siempre he encontrado en ti. Tú y tus chicas, Raquel y Cristina, haceis de vuestro laboratorio un lugar acogedor.

A mis compañeros de laboratorio José Manuel, José Morales, Juanjo y especialmente a Iván por tus palabras de ánimo, a Sergio y Elvira que aunque estuvisteis poco tiempo tengo grandes recuerdos, gracias por hacerme pasar momentos divertidos.

A los recientes compañeros del piso de abajo tengo que agradecerles el buen ambiente que se respira por ser gente tan agradable y divertida Pablo, Miguel, Raquel, José, Miguel, Jesús,,.... y como no a Pili Ochoa; a los laboratorios vecinos de la Dra. Susana Alemany con sus chicas tan simpáticas, a todos los compañeros del laboratorio del Dr. Juan Emilio Feliú por ser muy buenos vecinos, y al Dr. Victor Calvo y sus chicas, gracias a todos.

Y a mis antiguos vecinos del piso de arriba ,a los compañeros del laboratorio del Dr. Juan José Aragón: Oscar, Carmita, Valentina..., a todos los componentes del laboratorio del Dr. Antonio Sillero y la Dra. M^a Antonia Günther por ser gente tan maja, Anabel gracias por ayudarme tantas veces y ser tan salá, un beso también para Merche y su niña.

A Cari y a Angelines por su simpatía y en general a todos los Servicios que han facilitado nuestro trabajo.

Y ahora un gran abrazo a los que realmente han conseguido que no halla flaqueado en todo este tiempo a mis compañeros y amigos del B33, empezando por mi tutor el Dr. Antonio Cuadrado, gracias a Ana, Alberto, Mamen, como olvidarme de Raquel, del guapetón de Dani y muy especialmente de Marta, por haberme apoyado, aguantado, animado, ayudado..... y poder compartir tantos momentos divertidos.

A Alejandro, gracias sin ti este trabajo no podría haber sido posible y por estar siempre a mi lado.

Y por supuesto a mi excepcional familia con la que tengo apoyo de forma incondicional y a la que tanto quiero.

Todos vosotros también sois en parte autores de este trabajo. Gracias.

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

El proteasoma es un complejo macromolecular responsable de la degradación de la mayor parte de las proteínas intracelulares. En el presente trabajo se ha abordado el papel del proteasoma en enfermedades neurodegenerativas, como proteasa en la degradación de α -sinucleína, proteína implicada en la Enfermedad de Parkinson y en otras sinucleinopatías; y como autoantígeno en la Esclerosis Múltiple. El proteasoma 20S es responsable de la degradación de α -sinucleína tanto *in vitro* como *in vivo*, y no se requiere previa ubiquitilación. La α -sinucleína se comporta como un cis-degrón y se degrada por interacción directa con la subunidad C8 (α 7) del proteasoma. Las variantes de α -sinucleína, A30P y A53T, presentes en formas familiares de Enfermedad de Parkinson se comportan *in vivo* como α -sinucleína silvestre respecto a la susceptibilidad a: degradación por proteasoma, fosforilación por las proteína quinasas CKI, CKII, c-src y c-abl, y degradación por proteasoma previa fosforilación por las proteína quinasas antes mencionadas. La vida media de α -sinucleína es bastante larga sugiriendo que *in vivo* su interacción con lípidos de membrana y con otras proteínas previenen su degradación por proteasoma. La inhibición de la actividad del proteasoma conduce a la agregación citoplasmática de α -sinucleína, esta agregación mimetiza la situación que debe ocurrir en las sinucleinopatías. Todos estos resultados demuestran el papel central del proteasoma en la Enfermedad de Parkinson y en otras sinucleinopatías. El papel de proteasoma como autoantígeno en la Esclerosis Múltiple se demuestra por la presencia de anticuerpos anti-proteasoma (IgG e IgM), tanto en el suero (60%) como en el líquido cefalorraquídeo (80% en pacientes seropositivos) de estos pacientes. Se han mapeado dos epítomos lineales en las subunidades C2 (COOH-terminal) y C8 (región central) del proteasoma contra los que van dirigidos los autoanticuerpos contra estas subunidades. La respuesta anti-proteasoma es específica y aparece de forma temprana (primer brote) permaneciendo durante el curso de la enfermedad. La presencia de autoanticuerpos y de células T reactivas frente a proteasoma en pacientes con Esclerosis Múltiple son nuevos marcadores de esta enfermedad neurodegenerativa con posible utilidad clínica para el diagnóstico y/o pronóstico de esta enfermedad inflamatoria crónica.

SUMMARY

The proteasome is a macromolecular complex responsible for degradation of most part of intracellular proteins. In this work the role of proteasome in neurodegenerative disorders has been studied, as protease in the degradation of α -synuclein, a protein implicated in Parkinson Disease and in other synucleinopathies; and as autoantigen in Multiple Sclerosis. 20S proteasome is responsible for *in vitro* and *in vivo* degradation of α -synuclein, this process does not require prior ubiquitylation. The α -synuclein behaves like a cis-degron and is degraded by direct interaction with C8 (α 7) proteasomal subunit. The α -synuclein variants, A30P and A53T, found in familiar forms of Parkinson disease, behave like wild-type α -synuclein respect to its susceptibility to: degradation by proteasome, phosphorylation by protein kinases, CKI, CKII, c-src and c-abl, and degradation by proteasome after phosphorylation by the above mentioned protein kinases. The α -synuclein is a long-lived protein in the cell suggesting that *in vivo* its interaction with membrane lipids and other proteins prevents proteasomal degradation. The inhibition of proteasome activity in the cell promotes the cytoplasmic aggregation of α -synuclein, this aggregation may mimic the situation prevailing in the development of synucleopathies. All these results demonstrate the central role of proteasome in Parkinson disease and other synucleinopathies. The role of proteasome as autoantigen in Multiple Sclerosis is demonstrated by the presence of anti-proteasome (IgG and IgM) antibodies both in serum (60%) and cerebrospinal fluid (80% of seropositive patients) samples from these patients. Two linear epitopes for those autoantibodies have been mapped within the C2 (COOH-terminal) and C8 (central region) proteasomal subunits. The anti-proteasome response is specific and occurs early (first attack) and remains along the course of the disease. The presence of autoantibodies and reactive T cells to proteasome in patients with Multiple Sclerosis are new markers for this neurodegenerative condition with possible clinical utility for the diagnosis and/or prognosis of this chronic inflammatory disease.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1. DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA

1.1 Degradación de proteínas intracelulares	1
1.2 Sistema ubiquitina proteasoma	1
1.3 Proteasoma 20 y 26S.....	3

2. DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

2.1 Sistemas de protección celular contra proteínas dañadas	5
2.2 Agregación de proteínas y formación de cuerpos de inclusión	8
2.3 Agregación de sinucleína en enfermedades neurodegenerativas	
2.3.1 Enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías.....	9
2.3.2 Neurogenética de PD	10
2.3.3 Estructura y función de α -sinucleína	11

OBJETIVOS	16
------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Productos	17
1.2 Tampones y soluciones	18
1.3 Anticuerpos.....	19
1.4 Enzimas.....	19
1.5 Plásmidos	20

2. MÉTODOS

2.1 Purificación de proteínas	22
2.2 Obtención de anticuerpos.....	23
2.3 Electroforesis e inmunodetección de proteínas. Análisis por Far Western	23
2.3.1 Inmunodetección	23
2.3.2 Detección por unión de proteínas y <i>Far Western</i>	23
2.4 Ensayos de degradación <i>in vitro</i>	24
2.5 Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	25
2.6 Cultivos celulares.....	26
2.7 Transfecciones	26
2.8 Marcaje metabólico de células en cultivo	27
2.9 Inmunoprecipitaciones.....	27
2.10 Inmunotinción celular y localización subcelular de proteínas por microscopía de fluorescencia	28

3. MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS PARA EL ESTUDIO DE AUTO-ANTICUERPOS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

3.1 Sueros humanos	29
3.2 Determinación de isotipos de inmunoglobulinas.....	29
3.3 Ensayos de proliferación de linfocitos.....	30

RESULTADOS

1. ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN DE α -SINUCLÉINA POR EL PROTEASOMA 20S

1.1 El proteasoma 20S degrada α -sinucleína.....	31
1.2 Constantes cinéticas de degradación α -sinucleína silvestre y mutantes (A30P y A53T) por proteasoma	32
1.3 Caracterización de las regiones de α -sinucleína requeridas para el reconocimiento y degradación por el proteasoma.....	33
1.4 Subunidades del proteasoma implicadas en el reconocimiento de α -sinucleína	35
1.5 Degradación de α -sinucleína en cultivos celulares.....	38
1.6 Estudios de modificaciones post-traduccionales de α -sinucleína.....	43
1.7 Estudios de fosforilación de α -sinucleína <i>in vitro</i> por proteínas treonina / serina quinasas, CKI y CKII.....	44
1.8 Estudios de fosforilación de α -sinucleína <i>in vitro</i> por proteínas tirosina quinasas, c-src y c-abl.....	47
1.9 Estudios de fosforilación <i>in situ</i> de α -sinucleína por c-abl.....	51
1.10 Efecto de la fosforilación de sinucleína sobre la degradación por proteasoma 20S	52

2. ESTUDIOS DE AUTOANTICUERPOS EN SUERO Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE.....

2.1 Detección de anticuerpos anti-proteasoma en suero y en LCR de pacientes de EM.....	56
2.2 Los anticuerpos anti-proteasoma son predominantemente IgM e IgG en suero y en LCR	58
2.3 Detección de autoanticuerpos contra el proteasoma con subunidades recombinantes.....	59
2.4 Localización de los epítomos de anticuerpos anti-C2 de suero de pacientes con EM.....	61
2.5 Localización de los epítomos de anticuerpos anti-C8 de suero de pacientes de EM.....	62
2.6 Proliferación de PBMCs con antígenos proteasómicos recombinantes.....	64

DISCUSIÓN**1. PAPEL DE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS EN SINUCLEINOPATÍAS**

- 1.1 Degradación de α -sinucleína por proteasoma 20S..... 66
- 1.2 Modificaciones post-traduccionales de α -sinucleína 71
- 1.3 Relevancia funcional de la fosforilación de α -sinucleína 73
- 1.4 Efecto de fosforilación de α -sinucleína sobre la degradación por proteasoma 75
- 1.5 Papel de la vía ubiquitina-proteasoma en las sinucleopatías 76

2. PROTEASOMA EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS AUTO-INMUNES

- 2.1 El proteasoma como autoantígeno en EM 79
- 2.2 Respuesta autoinmune a proteasoma y patogénesis de EM..... 80

CONCLUSIONES 83**BIBLIOGRAFÍA** 84**ANEXO** 97

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

BCIP:	5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato
BIP:	Tampón de inmunoprecipitación
BSA:	Albúmina de suero bovino
DEAE:	Dietilaminoetilo
DMEM:	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EC1pP:	Componente proteolítico de la proteasa caseinolítica de <i>E coli</i>
EDTA:	Acido etilendiaminotetracético
EGTA:	Acido etilenglicol-bis- β -aminoetileter tetracético
EM:	Esclerosis múltiple
FBS:	Suero fetal bovino
GST:	Glutation S-Transferasa
HBS:	Tampón HEPES salino.
HEPES:	Acido 4-(2-hidroxietil)-1-pirerazín-etanosulfónico
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
HRP:	Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)
IPTG:	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
LB:	Cuerpos de Lewy
LCR:	Líquido cefalorraquídeo.
MCP:	Proteinasa multicatalítica, proteasoma
β-ME:	β -Mercaptoetanol
MG-132:	Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal; Z-LLL-CHO
NEM:	N- etilmaleimida
NBT:	"Nitroblue tetrazolium chloride"
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS:	Tampón fosfato salino
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PD:	Enfermedad de Parkinson
PMSF:	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PVDF:	Fluoruro de polivinildeno
SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
TBS:	Tampón de Tris salino

INTRODUCCIÓN

1. DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMA

1.1 Degradación de proteínas intracelulares

La degradación intracelular de proteínas se lleva a cabo fundamentalmente por dos vías: lisosomal y extralisosomal. Esta degradación está sometida a un estricto control para evitar la degradación inespecífica de proteínas. Un mecanismo de control viene dado por el confinamiento de la actividad proteolítica a compartimentos donde sólo pueden acceder proteínas señalizadas para degradación, como ocurre en la degradación lisosomal incluyendo la autofagia. La degradación de proteínas en los compartimentos nuclear y citoplásmico es mayoritariamente llevada a cabo por un complejo proteico denominado proteinasa multicatalítica o proteasoma (Hershko y Ciechanover, 1998; Voges y col., 1999). En este caso la compartimentarización es debida a la propia estructura de este complejo proteico, puesto que los sitios catalíticos se encuentran en el interior de la macromolécula y no son directamente accesibles para las posibles proteínas sustrato. Las proteínas que van a ser degradadas por el proteasoma requieren una señalización previa y una translocación al interior del complejo proteasoma para ser degradadas. Una de las vías de señalización a degradación por el proteasoma es la modificación de la proteína por poliubiquitilación, unión covalente a la proteína sustrato de varios residuos de una proteína pequeña de 76 a.a. denominada ubiquitina, por estar presente en todos los organismos eucarióticos estudiados (Hershko y Ciechanover, 1998). El sistema ubiquitina-proteasoma juega un papel importante en el recambio general de proteínas, en la eliminación de proteínas mal plegadas o dañadas, y en la regulación de una gran variedad de procesos celulares incluyendo control del ciclo celular, presentación de antígenos por MHC clase 1, transducción de señales, reparación de DNA, control transcripcional (Hershko y Ciechanover, 1998).

1.2 Sistema ubiquitina-proteasoma

La señalización de proteínas para degradación por la unión covalente de una cadena de poliubiquitina (cuatro o más ubiquitinas) es un proceso multienzimático en el que participan de forma secuencial tres actividades enzimáticas (E1, E2 y E3). En un primer paso la Gly COOH terminal de la ubiquitina es activado por una enzima activante (E1, Uba), requiriéndose ATP. Posteriormente, la ubiquitina activada se transfiere a una Cys del sitio activo de E1. Esta forma de E1 ubiquitilada es capaz de donar la ubiquitina a una Cys del

sitio activo de una proteína conjugante de ubiquitina (E2, Ubc). El tercer paso consiste en la transferencia de la ubiquitina desde E2 a un Cys de E3 (ligasa proteína-ubiquitina) y de esta última al grupo ε-amino de un residuo de Lys de la proteína sustrato por la formación de un enlace isopeptídico entre ese residuo de Lys y la Gly del C-terminal de la ubiquitina. Después de la unión de la primera ubiquitina a la proteína sustrato, generalmente se forma una cadena de poliubiquitinas en el cual el C-terminal de cada ubiquitina añadida es ligada a un residuo de Lys (K48, K29) de la ubiquitina anterior por los mismos enzimas antes descritos. El resultado es una proteína multiubiquitilada (Hershko y Ciechanover, 1998; Byrd y col., 1998; Varshavsky y col., 2000). La multiubiquitilación parece ser una señal efectiva para la señalización de una proteína a degradación por el proteasoma (Fig.1), aunque la multiubiquitilación a través de Lys63 cumple otras funciones celulares.

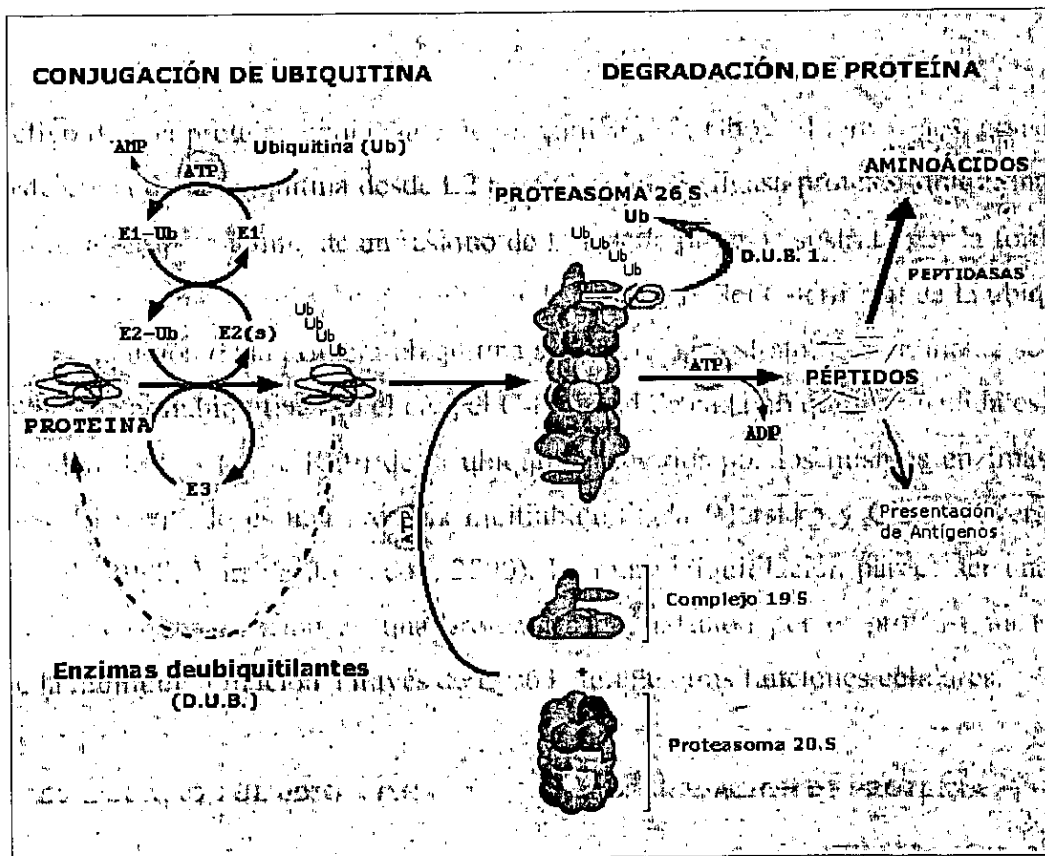


Figura 1. Sistema de degradación Ubiquitina-Proteasoma

En el proceso de degradación, la ubiquitina que ha servido para la señalización no es degradada sino que se recupera en forma de monómeros de ubiquitina, este proceso es llevado a cabo por una familia de proteasas denominadas DUB, enzimas de deubiquitilación. Las DUB encargadas de recuperar la ubiquitina de las proteínas

multiubiquitiladas se denominan proteasas de procesamiento de ubiquitina, UBP o isopeptidasas. Existe otro grupo de DUB que se encargan de la producción de ubiquitina a partir de proteínas que presentan la secuencia de ubiquitina seguida de una pequeña extensión C-terminal, son las UCH (hidrolasas ubiquitina C-terminal) cuya función es generar ubiquitina libre a partir de esas ubiquitinas con extensión C-terminal (Hershko y Ciechanover, 1998; Byrdy col., 1998; Varshavsky y col., 2000). La especificidad de sustrato del sistema de ligación de ubiquitina se debe a la E3 que actúa como proteína presentadora de la proteína sustrato a la E2 correspondiente.

1.3 Proteasoma 20S y 26S

El proteasoma 26S es una proteasa dependiente de ATP de 2000 kDa formada por dos complejos: el proteasoma 20S o complejo catalítico y un complejo regulador 19S (Voges y col., 1999). En mamíferos el proteasoma 20S también puede estar asociado a otros complejos reguladores: un complejo activador denominado PA28 o REG (Rechsteiner y col., 2000) y a un complejo inhibidor denominado PI31 (Chu-Ping y col., 1992; Zaiss y col., 1999).

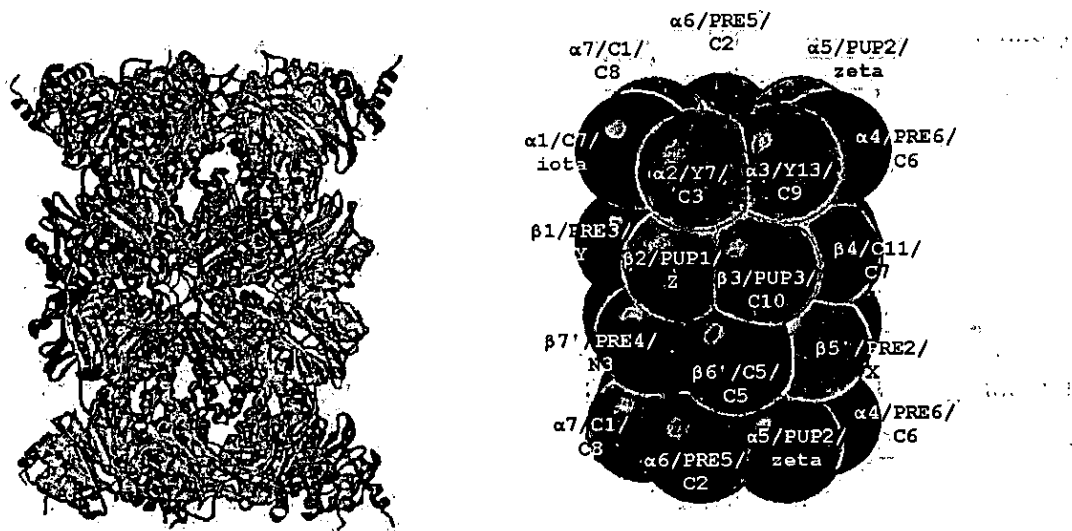


Figura 2. Estructura tridimensional y topología de las 14 subunidades diferentes de proteasoma 20S en *Saccharomyces Cerevisiae*.

La estructura cuaternaria del complejo 20S está conservada desde arqueobacterias hasta humanos (Voges y col., 1999). El proteasoma 20S (670kDa) tiene una estructura en

forma de cilindro de aproximadamente 150 Å de alto y 110 Å de diámetro formado por el apilamiento de 4 anillos heptaméricos (Pülher y col., 1992). El proteasoma de arqueobacterias contiene sólo dos tipos de subunidades diferentes α y β ; mientras el proteasoma de eucariotas está compuesto por 7 subunidades α y 7 subunidades β distintas (Voges y col., 1999). Los 2 anillos externos del cilindro están formados por 7 subunidades α y los dos internos por 7 subunidades β cada uno (Lowe y col., 1995; Groll y col., 1997; Bochtler y col., 1999) Esta estructura cilíndrica $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ está hueca en su interior definiendo tres cámaras: una cámara interna delimitada por la asociación de los dos anillos internos β y dos cámaras externas delimitadas entre los anillos α y β adyacentes (Fig.2).

Las subunidades α son proteolíticamente inactivas jugando un papel esencial en la estabilización de la estructura del complejo y además son responsables de la interacción con determinadas subunidades de los complejos reguladores 19S y PA28, una vez ensamblado el proteasoma 20S. Las subunidades α son las subunidades activas; en eucariotas sólo tres son activas $\beta 1/Y/\delta$, $\beta 2/Z$ y $\beta 5/X$ y las otras 4 aún siendo catalíticamente inactivas participan en la formación del sitio activo y en el reconocimiento del sustrato (Lowe y col., 1995; Groll y col., 1997). La hidrólisis del enlace peptídico es llevada a cabo por un ataque nucleofílico mediante la Thr1 N-terminal de las subunidades β activas, contribuyendo en la catálisis otros residuos próximos espacialmente a la Thr N-terminal (Lowe y col., 1995; Groll y col., 1997). El proteasoma 20S ha sido caracterizado como una proteinasa multicatalítica por presentar tres tipos de actividad peptidasa (Orlowski, 1990; Arribas y Castaño, 1990): actividad similar a quimotripsina que corta en el extremo C-terminal de aminoácidos hidrofóbicos; actividad similar a tripsina que corta después de aminoácidos básicos; y actividad similar a caspasa o actividad peptidil-glutamil hidrolasa (PGPH) que corta tras aminoácidos ácidos. Experimentos con inhibidores específicos y con mutantes de levaduras deficientes en distintas actividades peptidasas han permitido determinar que Arg 45 de $\beta 1$, Asp53 de $\beta 2$ y Met 45 de $\beta 5$ dan cuenta de la especificidad de la actividad PGPH, actividad similar a tripsina y actividad similar a quimotripsina, respectivamente (Groll y col., 1997; Groll y col., 1999). En mamíferos hay otras 3 subunidades β inducibles por interferón- γ con actividad catalítica, LMP2, LMP7 y MECL1, que sustituyen a las 3 subunidades constitutivas. La presencia de estas 3 subunidades inducibles en el proteasoma modifica su actividad proteolítica preferencial

generando péptidos más adecuados para la presentación por MHC de clase I (Rock y Goldberg, 1999; Kloetzel, 2001).

El proteasoma 26S se forma por la unión de dos complejos reguladores 19S a través de los anillos α a ambos extremos del proteasoma 20S (Voges y col., 1999), esta unión es dependiente de ATP (pero no su hidrólisis). El complejo 19S tiene una masa molecular aparente de 700 kDa, de ahí que también se denomine PA700 en mamíferos (en *D. melanogaster* se denomina partícula μ). Está formado por al menos 18 subunidades con un rango de masas moleculares aparentes de 30 a 120 kDa (Voges y col., 1999). En el componente regulador 19S se definen dos estructuras: la base y la tapa. La base contiene 9 subunidades, seis de las cuales pertenecen a la familia de las AAA ATPasas, y es la parte del complejo 19S por la que se asocia con los anillos α del proteasoma 20S. Se postula que las AAA ATPasas de la base tendrían como función el desplegamiento de las proteínas para ser canalizadas hacia el interior del complejo catalítico 20S y en este proceso se requeriría la hidrólisis de ATP. La tapa está constituida por el resto de las subunidades del complejo 19S. La función de la tapa sería el reconocimiento de las proteínas ubiquitiladas que van a ser degradadas, en parte mediada por la subunidad S5a. Además es componente de la tapa una subunidad DUB1 con actividad deubiquitilante (isopeptidasa) cuya función sería la recuperación de la ubiquitina (Voges y col., 1999). Por otro lado se ha demostrado que el complejo 19S tiene actividad chaperona (Braun y col., 1999) y participa sin asociarse al núcleo catalítico en otros procesos celulares, como por ejemplo en la reparación de DNA (Russell y col., 1999).

2. DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS Y ENFERMEDADES NEURO-DEGENERATIVAS

2.1 Sistemas de protección celular contra proteínas dañadas

En muchas enfermedades neurodegenerativas se produce un acúmulo de proteínas y la muerte celular de poblaciones específicas de neuronas. Muchas observaciones sugieren que los diferentes tipos de inclusiones surgen a través de mecanismos comunes y se producen similares mecanismos de respuesta celular. Un ejemplo de esto, es que todos estos agregados contienen componentes de la vía de degradación ubiquitina-proteasoma y

también chaperonas, que representan los dos principales sistemas que protegen a las células eucarióticas contra la agregación de polipéptidos (Sherman y Goldberg, 2001).

La estructura funcional de una proteína se alcanza tras el proceso de plegamiento de la proteína y la información necesaria para este proceso se encuentra en la propia secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, en las condiciones celulares este proceso de plegamiento no es espontáneo sino asistido. Dos familias de proteínas las chaperoninas y las chaperonas se encargan de facilitar el plegamiento adecuado de las proteínas acompañado por la hidrólisis de ATP. En condiciones de stress celular (stress térmico, oxidativo, etc) se produce la inducción de un grupo de genes altamente conservados que codifican para proteínas de choque térmico (Hsps), cuya función es precisamente prevenir la desnaturalización de las proteínas como consecuencia del stress. Muchas de estas proteínas de choque térmico son chaperonas moleculares, que como hemos mencionado funcionan en el plegamiento asistido. Este grupo de proteínas funcionan como la principal defensa celular contra la acumulación de proteínas dañadas, mutadas o mal plegadas (Frydman y Hartl, 1996). Además de las chaperonas, hay al menos dos vías más de protección al stress: enzimas antioxidantes, las cuales reducen el daño oxidativo disminuyendo los niveles de especies de oxígeno reactivas (superóxido dismutasas, hemo oxigenasas y catalasa); y la degradación de las proteínas dañadas o mal plegadas por la vía ubiquitina-proteasoma (Sherman y Goldberg, 2001).

En el grupo de chaperonas moleculares hay varias familias: Hsp 70 (Hsc70), Hsp90, Hsp104, Hsp 40 (DnaJ) y una familia de Hsp de pequeño tamaño como Hsp 27 y α -cristalino, y todas ellas se unen selectivamente a dominios desnaturalizados o mal plegados de polipéptidos (Feder y Hofmann, 1999). La mayoría de estas chaperonas se expresan en condiciones normales, y su expresión aumenta considerablemente como parte de la respuesta al stress. Algunas proteínas de choque térmico ayudan a prevenir la agregación de polipéptidos dañados y además Hsp 70 y Hsp 40 pueden funcionar en un proceso dependiente de ATP para catalizar el proceso de nuevo plegamiento sobre moléculas parcial o totalmente desnaturalizadas en formas enzimáticamente activas (Bukau y Horwich, 1998). Es de gran importancia la capacidad de cierta combinación de chaperonas, en concreto Hsp 70, Hsp 104 y Hsp 40, para desensamblar agregados intracelulares de proteínas y acelerar el replegamiento de proteínas insolubles en formas nativas solubles (Glover y Lindquist, 1998). Las funciones determinantes de chaperonas

moleculares en la protección contra enfermedades neurodegenerativas serían: prevención de agregación de proteínas mutadas y dañadas, facilitación de plegamiento de proteínas y ensamblaje de oligómeros, solubilización de agregados proteicos, promoción de ubiquitilación y degradación de proteínas anormales, promoción del plegamiento apropiado y glicosilación de proteínas secretadas y de membrana, supresión del programa apoptótico, y regulación de su propia expresión en citosol y retículo endoplásmico (Sherman y Goldberg, 2001).

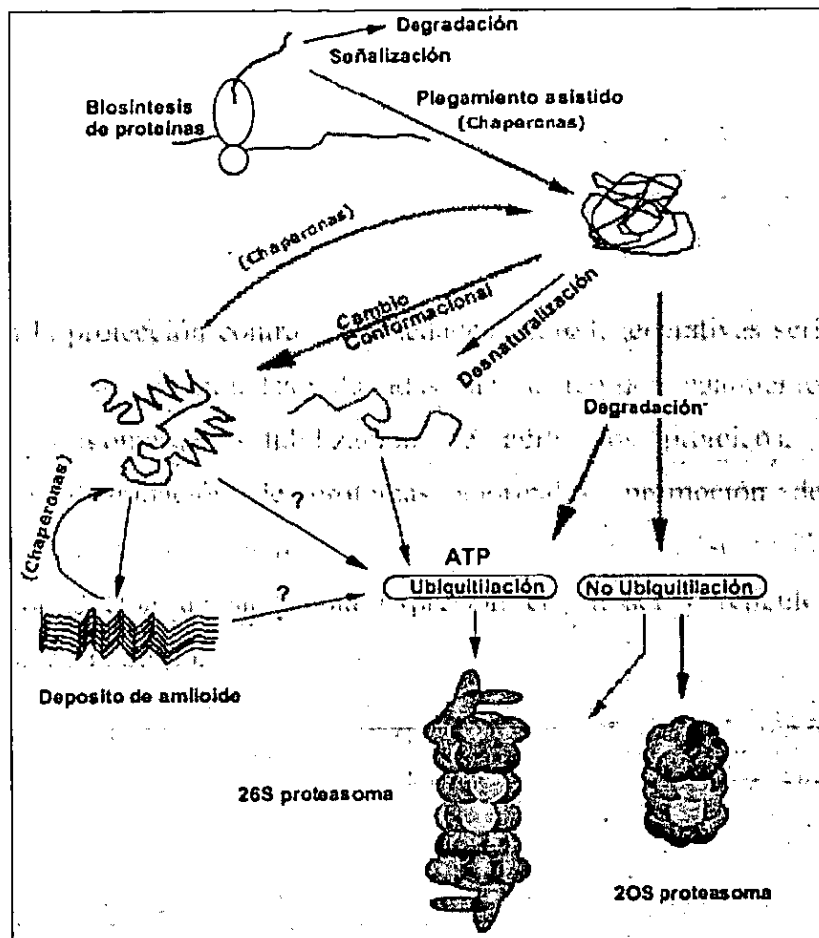


Figura 3. Procesos implicados en la proteólisis intracelular mediados por la vía ubiquitina-proteasoma.

La degradación de proteínas mal plegadas o dañadas por la vía ubiquitina-proteasoma, constituye una vía esencial de eliminación de esas proteínas dañadas. Además entre los genes inducidos por choque térmico se encuentran los genes que codifican por las Ubcs (E2) y los genes de que codifican para ubiquitina (Hershko y Ciechanover, 1998). La

reparación de proteínas dañadas y su degradación selectiva, son mecanismos complementarios que eliminan los polipéptidos mal plegados, los cuales pueden perturbar la función celular e iniciar el proceso de apoptosis. Además estos dos procesos no son independientes sino que parecen estar ligados en varios niveles. Las AAA ATPasas dentro del complejo regulador 19S del proteasoma, como hemos dicho anteriormente, tienen actividad similar a chaperonas y pueden bloquear la agregación y promover el nuevo plegamiento de proteínas desnaturalizadas (Braun y col., 1999; Strickland y col., 2000). Además las chaperonas Hsp70 y Hsp40, no solo son importantes en prevenir la agregación y el nuevo plegamiento, sino que son esenciales para la ubiquitilación y rápida degradación de muchas proteínas anormales (Lee y col., 1996; y (Lee y col., 1996; Bercovich y col., 1997). Aparentemente la capacidad de estas chaperonas para asociarse selectivamente con polipéptidos mal plegados facilita el reconocimiento del sustrato por E3 y quizá la degradación por proteasoma. Es evidente que si la capacidad de la célula para degradar o replegar los polipéptidos anormales es excedida, como ocurre experimentalmente cuando el proteasoma es inhibido, las proteínas desnaturalizadas o parcialmente plegadas se acumularán y tenderán a agregarse (Sherman y Goldberg, 2001) y eventualmente formarán inclusiones (Fig. 3).

2.2 Agregación de proteínas y formación de cuerpos de inclusión

En muchas enfermedades neurodegenerativas: enfermedades por expansión de gluta-minas (Huntington, Ataxia Espinocerebelosa), sinucleopatías (Enf. de Parkinson, Demencia por cuerpos de Lewy), Taupatías (Enf. de Alzheimer, Demencia Fronto-Temporal), se observa la aparición de agregados proteicos intracelulares insolubles. Inicialmente se asumió que estos agregados o cuerpos de inclusión resultaban de la tendencia inherente de las proteínas desnaturalizadas a asociarse con otras para formar agregados insolubles, como consecuencia de un cambio de estructura que favoreciera la formación de láminas β . Sin embargo, estudios recientes indican que la formación de los cuerpos de inclusión en células mamíferos es un proceso más complejo, en el cual la maquinaria celular parece estar implicada activamente (Sherman y Goldberg, 2001). Este parece ser el caso en la formación de unos cuerpos de inclusión perinucleares denominados genéricamente agresomas (Kopito, 2000; Johnston y col., 1998a). Los agresomas son unas estructuras de proteínas agregadas, que se localizan en el entorno al centro de organización de microtúbulos (MTOC) (Kopito, 2000; Johnston y col., 1998a; Fabunmi y col., 2000;

Wigley y col., 1999). Estas estructuras se observan mayoritariamente en células en las que falla el transporte de una o varias proteínas por la ruta secretora. Como consecuencia los polipéptidos que no progresan adecuadamente y son retrotranslocados del retículo endoplásmico y liberados al citoplasma. Estas proteínas retrotranslocadas tienen una gran tendencia a agregar y estos agregados serían transportados desde la periferia celular hacia MTOC por la red microtubular dando allí lugar a los agregomas (Johnston y col., 1998; García-Mata y col., 1999). En estos agregomas se han encontrado también localizadas proteínas de choque térmico, enzimas conjugantes de ubiquitina, y el proteasoma 26S (Kopito, 2000; Johnston y col., 1998a) (Fabunmi y col., 2000; Wigley y col., 1999). La formación de agregomas se acentúa cuando se añaden a las células inhibidores del proteasoma (Johnston y col., 1998b; García-Mata y col., 1999).

La situación en muchas enfermedades neurodegenerativas puede ser similar a lo descrito para los agregomas, los cuerpos de inclusión se formarían como respuesta celular a la imposibilidad de liberarse de un exceso de proteínas mutadas, dañadas o mal plegadas. El daño celular en consecuencia no sería tanto por el proceso de formación de estos agregados (que serían más bien un mecanismo de defensa), sino por otros mecanismos subsidiarios. Uno de esos mecanismos podría ser que la localización de proteasomas asociados a estas inclusiones, que se resisten a la degradación llevará al atrapamiento de proteasomas en un complejo degradativo no funcional y como consecuencia de este atrapamiento de proteasomas se reduzca la capacidad total de degradación de proteínas en la célula (Kopito, 2000).

2.3 Agregación de α -sinucleína en enfermedades neurodegenerativas

2.3.1 Enfermedad de Parkinson y otras sinucleinopatías

La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer (AD) afectando al 1% de la población de más de 50 años (Ebachi y col., 2001). La PD cursa con bradiquinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural. Estos síntomas son debidos a una gran reducción en el contenido de dopamina estriatal causada por la muerte de neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia negra. El principal marcador neuropatológico de la PD es la presencia de cuerpos de Lewy (LB), inclusiones proteínicas cuyo componente mayoritario es α -sinucleína (Spillantini y col., 1997). Sin embargo, la

presencia de cuerpos de Lewy ha sido observada en otras enfermedades como la demencia con cuerpos de Lewy y en variantes con parkinsonismo de enfermedades como: enfermedad de Alzheimer, Atrofia Múltiple Sistémica, enfermedad de Guam, enfermedad de Hallervorden-Spatz, y encefalopatía priónica. (Goedert, 2001). El fenotipo clínico de todas estas patologías es variable pero a nivel molecular todas presentan α -sinucleína con modificaciones post-traduccionales y conformacionales que favorecen la formación de fibras y agregación anormal en los cuerpos de inclusión de Lewy, de ahí que todas ellas hayan sido englobadas bajo la denominación de sinucleinopatías (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998).

Los cuerpos de Lewy son unas inclusiones citoplasmáticas esféricas, eosinofílicas que se encuentran generalmente en neuronas aunque también se observan en glía. Los LB contienen diversas proteínas: formas completas o truncadas de α -sinucleína (Spillantini y col., 1998) (Baba y col., 1998), ubiquitina (Spillantini y col., 1998), proteínas de neurofilamentos (Trojanowski y Lee, 1998), sinaptofisina (Takeda y col., 1998), ubiquitina C-terminal hidrolasa (Lowe y col., 1990), subunidades del proteasoma (Ii y col., 1997) y una variedad de otros determinantes antigénicos de otras proteínas. La localización de estas inclusiones en SNC varía según la forma de presentación clínica de la patología por LB (McKeith, 2000). En la enfermedad de Parkinson, los cuerpos de Lewy se encuentran en SNC (sustancia nigra, locus cereleus, núcleo dorsal del par X) y en el núcleo basal de Meynert (Verny y Duyckaerts, 1998). α -sinucleína es también el principal componente de las neuritas distróficas o de Lewy, otro marcador neuropatológico de PD (Lucking y Brice, 2000), y es el precursor del componente no A β (NACP) presente en las placas amiloides extracelulares características de la patología de AD (Ueda y col., 1993).

2.3.2 Neurogenética de PD

La mayor parte de los casos de PD son esporádicos, en una proporción pequeña se han encontrado diversos genes candidatos que parecen predisponer al padecimiento de PD por estudios de ligamiento en familias con varios individuos afectados. Los loci hasta ahora implicados en las formas hereditarias de PD se resumen en la Tabla 1 (Hardy y Gwinn-Hardy, 1998; Gasser, 2001).

PARK 1, 2 y 5 son loci codificantes para α -sinucleína, parkin e hidrolasas de ubiquitina C-terminal, respectivamente. PARK 3 y 4 no están identificados pero se sabe que

se localizan en loci ligados a PD con un patrón de herencia autosómico dominante, y PARK 6 y 7 están muy próximos en el cromosoma 1 y ligados a formas autosómicas recesivas de PD. El gen PARK 1 fue el primero identificado y corresponde a la α -sinucleína. En este gen se han encontrado dos mutaciones de cambio de sentido, A30P y A53T, asociadas a un número minoritario de casos de PD autosómico dominante (Polymeropoulos y col., 1997).

Tabla 1. Loci implicados en las formas familiares de PD

Loci	LOCALIZACIÓN	HERENCIA
PARK 1 (SNCA)	Ch 4 q21.3-q22	Autosómica dominante
PARK 2 (Parkin)	Ch 6 q25.2-q27	Autosómica recesiva
PARK 3	Ch 2 p13	Autosómica dominante
PARK 4	Ch 4 p	Autosómica dominante
PARK 5 (UCHL-1)	Ch 4 p	Autosómica dominante
PARK 6	Ch 1p35-36	Autosómica recesivo
PARK 7	Ch1p36	Autosómica recesivo

La identificación de mutaciones puntuales o deleciones en el gen de Parkin se dan en una forma autosómica recesiva (AR-JP), paradójicamente sin cuerpos de Lewy (Kitada y col., 1998). El gen de ubiquitina C-terminal hidrolasa L1 (PARK 5) es responsable de una forma autosómica dominante de PD, aunque sólo una familia ha sido encontrada con una mutación en este gen y no ha sido confirmado en otros pedígrics (Maraganore y col., 1999; Harhangi y col., 1999).

2.3.3 Estructura y función de α -sinucleína

La α -sinucleína es una proteína de 140 aminoácidos también conocida como NACP (por ser el precursor del componente no β -amiloide de las placas amiloideas en la enfermedad de Alzheimer) con poca estructura secundaria (Ueda y col., 1993). El análisis de su secuencia sugiere tres regiones (ver Fig. 4):

1) región N-terminal con repeticiones imperfectas de la secuencia KTKEGV que se extienden desde los aminoácidos 7 a 87 recordando los dominios anfipáticos de las apolipoproteínas (Davidson y col., 1998).

2) región NAC: (aminoácidos 60-95) rica en aminoácidos hidrófobos. Esta región es la que forma parte de las placas de amiloide en la AD (Ueda y col., 1993). En esta región se encuentran Gln 79 y Lys 80 que son los dos residuos implicados en el entrecruzamiento por transglutaminasa con el péptido A β de NAC en las placas seniles de AD (Jensen y col., 1995).

3) región C-terminal ácida (aminoácidos 96-140). Esta región es rica en aminoácidos ácidos y es responsable de la interacción de sinucleína con otras proteínas celulares.

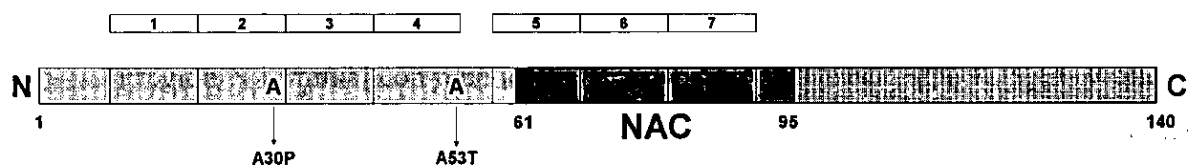


Figura 4. Estructura primaria de α -sinucleína humana. Principales regiones de α -sinucleína y localización de las 7 repeticiones anfipáticas (cajas), conteniendo la secuencia KTKEGV. Las mutaciones asociadas a PD, A30P y A53T están indicadas en la parte inferior del esquema.

La α -sinucleína en solución no tiene estructura secundaria apreciable y parece ser monomérica. Diversos tratamientos *in vitro*, incubación a altas concentraciones (7 mg/ml) y pH ácido durante días a 37°C o incubaciones a concentraciones más bajas 5 μ g/ml 65°C también durante días, promueven la oligomerización de la α -sinucleína y posterior formación de estructuras fibrilares insolubles ricas en láminas beta (Li y col., 2001; Uversky y col., 2001; Conway y col., 2000a; Conway y col., 2000b; Jo y col., 2000; Wood y col., 1999; Conway y col., 1998). La unión de α -sinucleína a fosfolípidos promueve un cambio conformacional en la proteína aumentando su contenido en α -hélice (dicroísmo circular) principalmente en la región N-terminal donde se localizan las repeticiones anfipáticas. Estudios por RMN han demostrado claramente el efecto de los fosfolípidos sobre la estructura de la región N-terminal de la proteína (Eliezer y col., 2001) y recientemente han permitido mostrar que incluso en ausencia de fosfolípidos esa región presenta una cierta tendencia a estructura de α -hélice (Bussell y Eliezer, 2001). Las sinucleínas mutadas,

A30P y A53T, parecen presentar una mayor rapidez en la formación de estructuras fibrilares que la sinucleína silvestre, aunque el efecto facilitador es más claro para la sinucleína A53T, comportándose la variante A30P de forma similar a la silvestre (Conway y col., 1998; Conway y col., 2000b; Conway y col., 2000a; Li y col., 2001; Narhi y col., 1999; Wood y col., 1999). Recientemente se ha demostrado que para la formación de las fibras de sinucleína la región imprescindible es la comprendida entre los a.a. 71-82 que corresponden a la región NAC altamente hidrofóbica (Giasson y col., 2001).

La sinucleína fue aislada por primera vez por rastreo de una genoteca de expresión de cDNAs de *Torpedo californica* usando antisuero contra vesículas dopaminérgicas purificadas (Maroteaux y col., 1988). El término sinucleína fue propuesto porque se observó inmunoreactividad en citosol principalmente en terminales presinápticos y rodeando al núcleo aunque la inmunoreactividad perinuclear no ha podido ser confirmada posteriormente. En vertebrados hay tres genes (Clayton y George, 1998) que codifican para tres formas de sinucleína: α , β , y γ (Tabla 2).

Tabla 2. Genes de sinucleína y localización cromosómica en humanos

SINUCLÉINA	GEN	LOCALIZACIÓN (humanos)
α	SNCA (PARKIN 1)	Ch 4 q21.3-q22
β	SNCB (HGMW)	Ch 5 q35
γ	SNCG (BCSG1)	Ch 10 q23

Estos 3 genes están compuestos de 5 exones de similar tamaño que codifican para proteínas de estructura parecida; su mayor identidad reside en la regiones N-terminal (Jakes y col., 1994).

La expresión de las sinucleínas, si bien es mayoritaria en SNC, parece ser ubicua. Los tres genes de sinucleína se expresan (a nivel de mRNA) mayoritariamente dentro del cerebro en tálamo, sustancia nigra, núcleo caudado y amígdala. Sólo α -sinucleína parece más abundante en núcleo subtalámico. La expresión en otros tejidos es variable y de hecho la γ -sinucleína (BCSG1) fue caracterizada como una proteína cuya expresión está aumentada en el carcinoma mamario, y recientemente se ha sabido que también se encuentra en cáncer de ovario (Bruening y col., 2000).

La función celular de la sinucleína no está todavía clara. Diferentes tipos de abordajes se han utilizado para estudiar la posible función de la sinucleína:

1) Relación con la plasticidad neuronal y transmisión sináptica. La expresión de sinelfina, ortólogo en pájaros de α -sinucleína, disminuye extensivamente en los centros neurales implicados en el aprendizaje del canto en canarios (George y col., 1995). Estos resultados implican que la sinucleína puede jugar un papel en la plasticidad neuronal, pero no parece tener un papel en la sinaptogénesis por el modelo de expresión durante el desarrollo (Hong y col., 1998; Petersen y col., 1999; Murphy y col., 2000). Por otro lado la α -sinucleína se asocia a vesículas sinápticas y es transportada por el componente vesicular rápido de transporte axonal en nervio óptico de rata (Jensen y col., 1999a). Esta unión a vesículas de cerebro de rata parece ser a través de la región de repeticiones anfipáticas de la zona N-terminal (Jensen y col., 1998). La interacción de α -sinucleína con fosfolípidos de membrana ha sido objeto de estudio más detallado utilizando micelas artificiales. La α -sinucleína se une preferentemente a vesículas conteniendo fosfolípidos ácidos (fosfatidilserina y ácido fosfatídico) y esa unión parece ser a través de la región amino terminal de la proteína cumpliendo un papel esencial las lisinas de las repeticiones anfipáticas (Davidson y col., 1998; Perrin y col., 2000; Jo y col., 2000). Las α -sinucleínas mutantes A30P y A53T parecen unirse con igual eficiencia que la forma silvestre, aunque algunos grupos han encontrado ciertas diferencias no siempre confirmadas. Así se describió que α -sinucleína A30P no se unía a las vesículas sinápticas (Jensen y col., 1998); sin embargo se ha mostrado que en el transgénico de ratón de A30P esta proteína se localiza perfectamente en las membranas presinápticas indicando que su transporte es similar al de α -sinucleína silvestre (Kahle y col., 2000).

2) Interacción de sinucleína con otras proteínas celulares.

Este abordaje ha sido realizado con muy diferentes metodologías y se han identificado varias proteínas que parecen interactuar con α -sinucleína y en algunos casos se ha identificado el efecto que produce esta interacción:

Inhibición de fosfolipasa D2. Tanto la α -sinucleína como la β -sinucleína son capaces de inhibir *in vitro* la actividad de la fosfolipasa D2 con una $K_{0.5}$ de 10 nM (Jenco y col., 1998).

Activación el transportador de dopamina (hDAT). La sobreexpresión de α -sinucleína produce una activación del transportador de dopamina y la α -sinucleína sobreexpresada coimmunoprecipita y colocaliza con este transportador, siendo la región NAC de la α -sinucleína la que interactúa con el COOH-terminal del hDAT (Lee y col., 2001).

Interacción con Tau y MAP1b. La interacción de α -sinucleína con Tau parece activar la fosforilación de Tau por PKA y tiene lugar a través de la región COOH terminal de sinucleína (87-140) por interacción con la región de interacción con microtúbulos de Tau (Jensen y col., 1999b). La interacción con MAP1b parece localizarse también en el COOH-terminal de la α -sinucleína (Jensen y col., 2000).

Interacción con maquinaria de transducción de señales. La sobreexpresión de α -sinucleína produce su asociación con las chaperonas 14-3-3 (con las cuales tiene cierta homología de secuencia) y con algunos sustratos de esta chaperona. Sinucleína sobreexpresada se asocia con PKC, inhibiendo su actividad; con BAD, y con ERK (Ostrerova y col., 1999). La sobreexpresión de α -sinucleína produce una disminución de la fosforilación de Elk-1 (Iwata y col., 2001a) y esto parece ser debido a una disminución de la activación de ERK1, 2 (Iwata y col., 2001b), que puede ser prevenido por sobreexpresión de una forma constitutivamente activada de MEK-1.

Interacción con sinfilina. Mediante la técnica de dos híbridos en levadura se aisló un cDNA que codifica para una nueva proteína, denominada sinfilina que interactúa específicamente con α -sinucleína (Engelender y col., 1999). Esta interacción está mediada a través del dominio N-terminal de sinucleína (aa 1-39) en ensayo de dos híbridos de levadura, pero en células de mamífero parece ser que la interacción tiene lugar por la región COOH terminal de sinucleína (Kawamata y col., 2001).

Estudios realizados en knock-out y transgénicos. El knock-out de α -sinucleína de ratón es viable y no presenta alteraciones ni en el número de células dopaminérgicas, ni en sus conexiones, aunque tiene una reducción en el contenido de dopamina en el estriado (Abeliovich y col., 2000). Estos resultados están de acuerdo con el fenotipo normal y que presentan ciertos ratones C57BL/6J (frecuentemente usados para los cruces retrógrados) que presenta una delección cromosómica que comprende el gen de la α -sinucleína y que además no tienen aumento de expresión compensatoria de β y γ -sinucleína (Specht y

Schoepfer, 2001). Se han publicado varios modelos de animales transgénicos que expresan bien la α -sinucleína silvestre o las variantes A30P y A53T (Beal, 2001). La transgénesis en *Drosophila* de la α -sinucleína humana silvestre y de las dos variantes A53T y A30P bajo el control de un promotor de GAL4 y cruzado con animales que tienen el gen de GAL4 bajo el control de diversos promotores (panneuronal, dopaminérgico o específico de ojo). La expresión bajo el control del promotor de DOPA decarboxilasa produce una pérdida de neuronas dopaminérgicas y pérdida de la capacidad de las moscas para escalar por la pared del contenedor donde se mantienen, este efecto aparece un poco mas tempranamente en las moscas transgénicas de A30P que en las transgénicas de A53T y silvestre, aunque el grado de destrucción de neuronas dopaminérgicas no es significativamente diferente (Feany y Bender, 2000). Los modelos en ratón han producido resultados contradictorios respecto al daño de neuronas dopaminérgicas como consecuencias de la expresión de α -sinucleína silvestre y de los mutantes humanos. La transgénesis de α -sinucleína bajo el control de un promotor panneuronal (Th-1) o de un promotor específico de neuronas dopaminérgicas (Tiro-sina hidroxilasa) da como resultado un fenotipo de muerte de neuronas (o específicamente de neuronas dopaminérgicas) con la aparición de agregados de sinucleína (Kahle y col., 2000; Masliah y col., 2000; van der y col., 2000), o bien a la ausencia total de fenotipo (Matsuoka y col., 2001) y con igual sensibilidad a MPTP que los ratones silvestres (Rathke-Hartlieb y col., 2001).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo se han centrado en dos tipos de enfermedades neurodegenerativas: Enfermedades que presentan un acúmulo de proteínas agregadas y Enfermedades que presentan un claro componente autoinmune.

Del primer tipo, el estudio se ha centrado en sinucleinopatías, en las que se produce la agregación intracitoplásmica de α -sinucleína formando los cuerpos de Lewy característicos de la enfermedad de Parkinson y de otras sinucleinopatías. Esta agregación de α -sinucleína sugiere que la degradación de α -sinucleína podría jugar un papel en la patogénesis de la sinucleinopatías. Por ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- Estudio de la(s) proteasa(s) responsable(s) de la degradación de α -sinucleína.
- Estudio de las posibles diferencias en la degradación entre sinucleína silvestre y dos formas mutadas, A30P y A53T, que se habían descrito en formas familiares de Enfermedad de Parkinson de comienzo temprano
- Estudio de posibles modificaciones post-traduccionales (fosforilación) de α -sinucleína.
- Estudio del posible efecto que las modificaciones post-traduccionales pudiera tener sobre la degradación, tanto de α -sinucleína silvestre como de las dos formas mutadas.

Del segundo tipo de enfermedades neurodegenerativas se ha abordado un estudio en Esclerosis Múltiple. Nuestro laboratorio había descrito la presencia de autoanticuerpos contra proteasoma en sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (Arribas y col, 1991). Trabajos posteriores de nuestro grupo demostraron que los autoanticuerpos anti-proteasoma no estaban presentes en varias enfermedades autoinmunes incluyendo: artritis reumatoide, vasculitis, dermatomiositis, polimiositis, escleroderma, tiroiditis autoinmunes, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y hepatitis autoinmune (Mayo y col, 2000). Sin embargo en un screening inicial de unos cuantos sueros de pacientes con Esclerosis Múltiple encontramos la presencia de autoanticuerpos contra proteasoma. Esto nos llevo a plantearnos un estudio detallado de la respuesta anti-proteasoma en pacientes con Esclerosis Múltiple con los siguientes objetivos:

- Caracterización de la respuesta humoral anti-proteasoma en suero y líquido cefaloraquídeo.
- Caracterización de los epítomos de las subunidades del proteasoma contra los que van dirigidos los autoanticuerpos.
- Caracterización de la posible respuesta celular contra proteasoma

MATERIALES Y MÉTODOS

1 MATERIALES

1.1 Productos

Antibióticos: ampicilina y kanamicina de Sigma.

Manipulación de DNA: Obtención de DNA plasmídico: Midi-prep de Quiagen y "Wizard Plus Maxipreps" de Promega, lisozima de Sigma. Enzimas de restricción de MBI Fermentas, Gibco BRL, Roche Molecular Biochemicals y New England Biolabs, fosfatasa alcalina de Roche. Agarosa de Pronadisa, agarosa de bajo punto de fusión de BioWhittaker. Marcadores de peso molecular de DNA λ /HindIII y escala de 100 pb de GibcoBRL y sistema de extracción de DNA desde geles de agarosa (Gene Clean) de BIO 101.

Productos utilizados en PCR: AmpliTaq Gold-Polimerasa y $MgCl_2$ de Perkin-Elmer, dNTPs de Roche y el sistema de mutagénesis dirigida "QuikChange" de Stratagene.

Resinas para purificación de proteínas: DEAE-celulosa de Whatman, hidroxipatito de BioRad y Glutation Sefarosa de Amersham Pharmacia.

Material para electroforesis suministrado por BioRad; marcadores de bajo peso molecular para SDS-PAGE y NEM de Sigma, β -ME de Merck-Schuchardt. Transferencia e inmunodetección: membranas de nitrocelulosa (BA 85, Schleicher & Schuell) o Inmobilon-P (Millipore), rojo de Ponceau de Carlo Erba, Tween 20 de BioRad. BSA, NBT, BCIP, ácido Cumárico y Luminol de Sigma. Anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina o peroxidasa de Sigma y BioRad. NHS-Biotina de Pierce, estraptavidina-fosfatasa alcalina de Sigma. Proteína A-Sefarosa utilizada en las inmunoprecipitaciones suministrada por Amersham Pharmacia.

Inhibidores de proteasas: MG132 y lactacistina de Calbiochem, PMSF, Leupeptina y Pepstatina A de Sigma.

Ensayos de fosforilación: ATP de Roche. γ [^{32}P]ATP (3000Ci/mmol) de Amersham Pharmacia. Marcaje metabólico con L[^{35}S] metionina/cisteína (1000Ci/mmol) y en los ensayos de proliferación [3H] timidina (48 Ci/mmol) de Amersham Pharmacia.

Cultivos celulares: material plástico de Falcon, Nunc, Sarstedt. DMEM, FBS y L-Glutamina de GibcoBRL, DMEM sin metionina/cisteína de ICN, Gentamicina de Genta Gobens, G418 Sulfato de Promega, poli L-lisina de Sigma y DMSO de Pierce.

Los medios de cultivo líquido y placas para bacterias, EDTA 0.5 M pH 8.0, HEPES pH 7.5, PBS 10X, NaOH 10 N, TBE 10X, Tris HCl pH 6.8 y pH 7.5 y *E. coli* DH5 α competentes han sido suministrados por el Servicio Técnico de Preparación de medios de cultivo del IIB "Alberto Sols". *E. coli* BL21 competentes fueron obtenidas en el laboratorio. Para la inducción de la expresión de proteínas se utilizó IPTG de Roche.

El resto de reactivos utilizados de calidad analítica fueron suministrados por las siguientes casas comerciales: Merck, Carlo Erba, Probus, USB, Panreac, Riedel-de Häen, Sigma, BioRad y Roche.

1.2 Tampones y soluciones

- HBS 2X: 50 mM HEPES pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄.
- Tampón de carga SDS 2X: 250 mM Tris HCl pH 6.8, 8 % glicerol, 4% SDS, 0.01% de azul de bromofenol conteniendo 0.28 M β -mercaptoetanol (β -ME) o 100 mM N-etilmaleimida (NEM).
- TBS: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl..
- T-TBS: TBS, 0.1% Tween-20.
- T-TBS-BSA: T-TBS, 3% BSA.
- TNM: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.
- BIP: TBS, 0.5% Nonidet P-40.
- Tampón de inmunoprecipitación para estudios de fosforilación (BIP-Ph): 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.5% NP 40, 10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 20mM NaF, 10 mM glicerofosfato y 1mM ortovanadato sódico, justo en el momento de utilizarlo se añaden los siguientes inhibidores de proteasas 0.5mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptina y 1 μ g/ml pepstatina.
- PBS pH 7.4: 4.3 mM Na₂HPO₄.7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl.

1.3 Anticuerpos

– Anticuerpo anti-Sinucleína: anticuerpo monoclonal de ratón (clon 41) generado contra la región comprendida entre los aminoácidos 15 a 123 de sinucleína-1 de rata (Transduction Laboratories).

– Anticuerpo anti-P-Tyr: anticuerpo monoclonal de ratón (clon PY20) conjugado con peroxidasa (Transduction Laboratories).

– Anticuerpo anti-GFP: anticuerpo monoclonal ratón y policlonal de conejo contra la GFP (Clontech).

– El resto de anticuerpos primarios utilizados son anticuerpos policlonales de conejo obtenidos en nuestro laboratorio (ver Métodos 2.2).

– Anticuerpos secundarios de cabra contra Ig G (H+L) de conejo o ratón acoplados a peroxidasa (HRP) o fosfatasa alcalina de BioRad. Anticuerpos anti-Ig A, anti-Ig G y anti-Ig M humanos conjugados a fosfatasa alcalina (Sigma).

– Alexa Fluor 594: anticuerpo secundario de cabra contra Ig G (H+L) de conejo o ratón conjugados al fluorocromo Alexa Fluor rojo (Abs/Em máxima: 590/617 nm), de Molecular Probes.

1.4 Enzimas

– **Caseína quinasa I (CKI)**: serina/treonina quinasa suministrada por New England Biolabs; actividad 1.000.000 U/ml ensayada sobre el péptido sustrato KRRRALS(P)VASL PGL siendo S(P), fosfoserina.

– **Caseína quinasa II (CKII)**: serina/treonina quinasa obtenida y purificada según se describe en (Castaño y col., 1996), actividad específica de 20.000 U/mg ensayado sobre β -caseína como sustrato.

– **Src (p60 c-src)**: tirosina quinasa parcialmente purificada suministrada por Upstate Biotechnology; actividad específica 900.000 U/mg ensayado sobre el péptido KVEKIGEG TYGVVYK correspondiente a los residuos 6-20 de p34cdc2.

– **Abl**: proteína tirosina quinasa c-Abl conteniendo el dominio N terminal fusionado al SH2 y seguido del dominio catalítico (SH3), suministrada por New England Biolabs;

actividad de 100.000 U/ml ensayado sobre el péptido sustrato EAIYAAPFAKKK.

1.5 Plásmidos

– **pT- α -syn**: el cDNA de sinucleína humana fue obtenido por PCR con los oligonucleótidos 5' 5'-CATTACCATATGGGATGTATTCATGAAAGGAC-3' con una diana para *Nde* I (las secuencias diana para las endonucleasas de restricción aparecen subrayadas) y el oligonucleótido 3' con la secuencia diana para *Sal* I 5'-AGAGTCGACTTAGGCTTCA

GGTTCG-3' utilizando como molde una genoteca de cDNA de placenta humana y clonado en los sitios *Nde* I y *Sal* I del vector pT7-7.

– **pT- α -syn A30P** y **pT- α -syn A53T**: Obtenidos por amplificación desde pT- α -syn mediante oligos internos 5' y 3' conteniendo la mutación puntual y los oligos de los extremos 5' y 3' α -syn de correspondientes.

– Las construcciones de **pT- α -syn con mutaciones puntuales (S129A, Y39F, Y125F, Y133F, Y136F, Y39F/Y125, Y39F/Y133F, Y39F/Y136F, Y39F/Y125F/Y133F, Y39F/Y125F/Y136F)** fueron obtenidas por PCR utilizando el sistema de mutagenesis dirigida de Stratagene "QuikChange" y los oligonucleótidos 5' y 3' conteniendo las mutaciones correspondientes.

– **pT- α -syn StyI**: obtenido desde pT- α -syn por delección del fragmento interno *StyI-StyI* de α -sinucleína y posterior religación.

– **pT- α -syn stop109**: obtenido por amplificación por PCR de pT- α -syn mediante oligonucleótidos internos 5' y 3' 5'-AGAAGGAGCCCCACAG***T***AGGAATTCTGGAG ATATGC-3' y 3' 5'-GCATATCTTCCAGAATTCT***T***ACTGTGGGGCTCCTTCT-3' con una mutación puntual (en negrita) que introduce un codón de terminación (itálica) en la posición 109, utilizando el sistema de mutagénesis dirigida de Stratagene "QuikChange".

– **pGEX- α -syn**: obtenido por amplificación por PCR con los oligonucleótidos 5' 5'-GGAGGGTCGACCAATGGATGTATTCATGAAAGG-3' y 3': 5'-AGAGTCGACTT AGGCTTCAGGTTTCG-3' conteniendo ambos diana para *Sal* I (subrayadas) utilizando como molde pT- α -syn y clonaje en el sitio *Sal* I de pGEX 4T1.

– **pGEX- α -syn Ct**: obtenido por subclonaje del fragmento de α -sinucleína *Eco* RI-*Eco* RI de pT- α -syn en el sitio *Eco* RI de pGEX-4T1.

– **pGEX- α -syn Ct**: obtenido por subclonaje del fragmento COOH terminal de α -sinucleína *EcoRI-Sal I* de pT- α -syn en los sitios *EcoRI-Sal I* de pGEX-5X2.

– **pGEX- α -syn StyI**: obtenido desde pGEX- α -syn por delección del fragmento *StyI-StyI* interno de α -sinucleína y posterior religación.

– **pEYFP- α -syn**: obtenido por subclonaje de α -sinucleína amplificada con los oligonucleótidos 5' y 3' con diana para *Sal I* utilizados en el clonaje de α -syn en pGEX 4T1 y clonado en el sitio *Xho I* del vector pEYFP-C1 (Clontech).

– **pcDNA c-abl**, **pcDNA c-abl K290M** y **pcDNA c-abl SH3** Construcciones en pcDNA de c-abl humano, copia completa con una mutación puntual que anula la actividad kinasa (K290M) y con una delección del dominio SH3, respectivamente, fueron amablemente cedidos por el Dr. David Baltimore.

– **pGEX-Crk**: fusión de c-Crk con GST, cedido amablemente por el Dr. Piero Crespo.

– **pGEX-C2Ct**: obtenida por amplificación por PCR de la secuencia codificante para los últimos 16 aminoácidos de la subunidad C2 utilizando como molde pT-mC2 y subclonado en pGEX 4T1.

– **pGEX-hC8Ct**: obtenido por subclonaje del fragmento *EcoRV-Sal I* de cDNA de la subunidad C8 humana del proteasoma en el sitio *Sma I/Sal I* del vector pGEX 4T1.

– Los plásmidos **pT-mC2**, **pT-mC5**, **pT-mC9** y **pT-hC8**, que codifican para las subunidades del proteasoma C2, C5 y C9 de ratón y C8 humano; y las construcciones obtenidas a partir de **pT-mC2**, **pT-mC2.22**, **pT-mC2.23**, **pT-mC2.24** y **pT-mC2.2** fueron obtenidos según se ha descrito (Arribas y col., 1994).

– Las construcciones: **pT-HC8.1**, **pT-HC8.2**, **pT-HC8.3** y **pT-HC8.6** han sido descritas previamente (Castaño y col., 1996).

– **pT-HC8.7** obtenido por delección del fragmento *Pst I-Pst I* de pT-HC8 y posterior religación.

– **pRSET-HC8.8** obtenido por subclonaje del fragmento *Hind III-Hind III* de pT-HC8 en el sitio *Hind III* de pRSET.

Todos los cDNAs fueron secuenciados totalmente por el método de dideoxinucleótidos en el Servicio Técnico de Secuenciación del IIB "Alberto Sols".

2. MÉTODOS

2.1 Purificación de proteínas

La purificación de proteasoma a partir de hígado o cerebro de rata y de eritrocitos humanos fue realizada según se ha descrito con anterioridad (Arribas y Castaño, 1990; Ruiz-de-Mena y col., 1993). La proteasa de *E. coli* EClpP fue purificada como se ha descrito previamente (Arribas y Castaño, 1993).

Las subunidades recombinantes del proteasoma C2, C5, C8 y C9, así como las construcciones obtenidas a partir de C2 y C8 utilizadas para mapear los epitopos, se purificaron a partir de cultivos de *E. coli* BL21 transformadas con los respectivos plásmidos y fueron purificadas por métodos previamente descritos (Arribas y col., 1994; Castaño y col., 1996; Rodríguez-Vilariño y col., 2000).

Las construcciones de fusión con GST se purificaron a partir de cultivos de bacterias *E. coli* DH5 α , transformadas con los respectivos plásmidos, por cromatografía de afinidad con una resina de Glutation-Sefarosa según se ha descrito (Smith y Johnson, 1988).

Las proteínas recombinantes α -sinucleínas: silvestre, A30P, A53T, α -syn Sty y todos las α -sinucleínas con mutaciones puntuales utilizadas en los estudios de localización de sitios de fosforilación, fueron purificadas esencialmente como se ha descrito (Weinreb y col., 1996) con un paso final de purificación por HPLC en una columna de DEAE-5PW y elución con un gradiente lineal desde 50 mM hasta 0.6 M de NaCl en 50 mM Tris-HCl pH 7.4. La construcción α -syn stop109 que carece de la región COOH terminal de α -sinucleína, una región rica en aminoácidos con carga negativa, provoca un cambio en el punto isoeléctrico (pI 9.2) lo cual hizo necesario cambiar el protocolo de purificación utilizado con sinucleína. Para purificar α -syn stop109 se aplicó el extracto bacteriano, tras el tratamiento con calor, a una columna DEAE-celulosa aplicando la fracción no retenida directamente a una columna de hidroxapatito equilibrada en tampón fosfato 10 mM pH6.8. La α -syn stop109 se eluyó con un gradiente de tampón fosfato potásico pH 6.8 de 10 mM hasta 0.5 M, las fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 18% y las fracciones conteniendo α -syn stop109 con masa molecular aparente de 11 kDa se juntaron y se dializaron frente a H₂O destilada.

2.2 Obtención de anticuerpos

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra GST, α -sinucleína y contra la subunidad C2 del proteasoma se generaron en conejos por inmunización (100 μ g por inyección) con la proteína purificada correspondiente en cada caso según se ha descrito (Arribas col., 1994). La purificación por afinidad de los anticuerpos contra proteasoma purificado y contra la subunidad del proteasoma HC8 recombinante se realizó según se ha descrito (Arribas y col., 1991; Castaño y col., 1996).

2.3 Electroforesis e inmunoblot de proteínas. Análisis por "Far Western"

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a los porcentajes de acrilamida indicados en cada caso según el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o de PVDF para analizar por inmunodetección (Arribas y col., 1991; Castaño y col., 1996).

2.3.1 Inmunodetección

Las membranas transferidas se tiñeron de forma reversible con rojo Ponceau para comprobar la transferencia. Los filtros se incubaron 3 h con el tampón de bloqueo T-TBS-BSA, 3h con el anticuerpo primario en T-TBS BSA (la dilución se indica en cada caso), seguido de 3 lavados con T-TBS (10 min cada uno) y posterior incubación durante 1 h con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina o a peroxidasa a dilución 1/1000-1/5000 en T-TBS BSA. Las membranas se revelaron con los sustratos cromogénicos NBT y BCIP cuando el anticuerpo secundario estaba acoplado a fosfatasa alcalina y con los sustratos quimioluminiscentes Luminol y ácido Cumárico cuando estaba acoplado a peroxidasa como se ha descrito (Mayo y col., 2000).

2.3.2 Análisis por "Far Western"

Para la caracterización de las subunidades del proteasoma responsables de la interacción con α -sinucleína, se marcó α -sinucleína con biotina. Para obtener α -sinucleína biotinilada incubamos α -sinucleína con NHS-biotina a temperatura ambiente durante 2 h, se bloqueó el exceso de biotina con 0.5 M Tris-glicina como describe la casa suministradora (Pierce) y finalmente la sinucleína biotinilada fue dializada frente a agua desionizada.

Para analizar la degradación de α -sinucleína biotinilada por proteasoma 20S (ver Métodos 2.4), los productos de reacción fueron separados por SDS-PAGE al 16% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó 3 h con T-TBS 3% BSA a temperatura ambiente y posteriormente 30 min con 0.25 μ g/ml de estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina en el anterior tampón de bloqueo. El filtro se lavó 3 veces (por 10 min cada una) con T-TBS, una vez con TBS, para eliminar el BSA y el Tween, y un último lavado con el tampón de revelado, TNM. La unión de estreptavidina-fosfatasa alcalina a biotina fue revelada por incubación de BCIP y NBT en el tampón TNM.

Para el estudio de unión de α -sinucleína a proteasoma o a las subunidades recombinantes del proteasoma (Far Western) se separaron las subunidades recombinantes del proteasoma, el proteasoma y GST por SDS-PAGE al 16% y se transfirieron a nitrocelulosa. Tras la transferencia, la membrana se incubó en tampón de bloqueo (50 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl y 0.1% Tween) con 0.1% BSA durante 2 h, posteriormente se añadió 1 μ g/ml de α -sinucleína biotinilada y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados (10 min cada uno) con el tampón de bloqueo anterior, se incubó 30 min con 0.25 μ g/ml de estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina en el tampón de bloqueo (todo el proceso se realizó a temperatura ambiente). La membrana se lavó 3 veces con tampón de bloqueo (10 min cada lavado), una vez con TNM y finalmente fue revelada con BCIP y NBT.

2.4 Ensayos de degradación *in vitro*

Los ensayos de degradación se realizaron en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 20 mM HEPES pH 7.4, 5 mM EDTA, 5 mM de EGTA, 1-2 μ g de proteasoma y 1-5 μ g de las diferentes α -sinucleínas. Las reacciones se realizaron a 37°C durante diferentes tiempos y se pararon con tampón de carga SDS con β -ME y ebullición durante 5 min. Los ensayos se analizaron por SDS-PAGE al 16%.

En el ensayo de degradación de α -sinucleína biotinilada por proteasoma se utilizó 1 μ g del sustrato y los mismos reactivos y condiciones detallados arriba. El análisis de las reacciones se realizaron por SDS-PAGE al 16%, transferencia a nitrocelulosa y posterior detección por unión de estreptavidina (ver Métodos 2.3).

Para los ensayos de degradación de EYFP- α -syn, la proteína previamente

inmunoprecipitada (como se describe en Métodos 2.9) se lavó 2 veces con 20 mM HEPES pH7.4, 5 mM EDTA y 5 mM EGTA. Las reacciones se realizaron en un volumen de final de 20 μ l conteniendo: un volumen de Proteína A-sefariosa con EYFP- α -syn inmunoprecipitada (equivalente al contenido de EYFP- α -syn inmunoprecipitado de 10^5 células) en el tampón indicado más arriba, en presencia o ausencia de 4 μ g de proteasoma. Las reacciones se realizaron a 37°C durante diferentes tiempos con agitación constante y se pararon con tampón de carga SDS con NEM y ebullición durante 5 min. Los ensayos se analizaron por SDS-PAGE al 10% e inmunodetección con anticuerpos anti-sinucleína monoclonal, como se describe en Métodos 2.3.

La cuantificación de la degradación de las proteínas fue realizada por densitometría de escáner del autorradiograma con el SilverScan conectado a Macintosh IICi usando el programa NIH image V1.56.

2.5 Ensayos de fosforilación *in vitro* y degradación de proteínas fosforiladas

Las reacciones de fosforilación fueron realizadas por incubación a 30°C durante 30 min en un volumen final de 20 μ l conteniendo: 2-40 μ M de las distintas α -sinucleínas ensayadas, las cantidades de quinasa que se indican y γ [32 P] ATP en el tampón de ensayo correspondiente. En la fosforilación por CKI utilizamos 200 U de CKI en tampón de ensayo (50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) pH7.5 de la casa comercial New England Biolabs y 100 μ M γ [32 P] ATP (0.25 μ Ci/nmol). La fosforilación por CKII fue realizada con 8 U de quinasa y 100 μ M γ [32 P] ATP (0.25 μ Ci/nmol) en 25 mM HEPES pH 7.4 y 10 mM MgCl₂. La fosforilación por Src se realizó con 1 U de quinasa y 20 μ M γ [32 P] ATP (2.5 μ Ci/nmol) en el tampón: 20 mM Tris HCl pH 7.5, 15 mM MnCl₂. Los ensayos de fosforilación por Abl llevaban 20 U de proteína quinasa en tampón de ensayo (50 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM DTT y 0.001% Brij) de New England Biolabs y 20 μ M γ [32 P] ATP (2.5 μ Ci/nmol).

Las reacciones de fosforilación se pararon con tampón de carga SDS con β -ME y ebullición durante 5 min y se analizaron por SDS-PAGE al 16% (18% para los ensayos con α -syn stop109 de 11 kDa). Para el análisis de la degradación de sinucleínas fosforiladas, las reacciones de fosforilación fueron paradas con EDTA y EGTA 5 mM y hervidas por 2 min. Las reacciones de degradación se realizaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los geles se secaron, se expusieron a películas de rayos X y se

cuantificó la radiactividad mediante Instant Imager (Perkin-Elmer).

2.6 Cultivos celulares

Las líneas celulares CHO (células de Ovario de Hamster Chino) y PC12 (células de feocromocitoma adrenal de rata) se cultivaron en DMEM con 10% de FBS, 2 mM de L-Glutamina y 50 µg/ml de Gentamicina a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

2.7 Transfecciones

Las líneas celulares CHO y PC12 se sembraron a la dilución adecuada para conseguir una confluencia del 60-70% a las 24 h. En este momento las células fueron transfectadas con los correspondientes plásmidos utilizando cloruro cálcico (según el protocolo de Promega). Este método consiste en preparar para una placa de 60 mm una mezcla con 37 µl de 2 M CaCl₂, 4 µg del DNA a transfectar y agua desionizada estéril hasta alcanzar un volumen de 0.3 ml, a esta mezcla se le añade 0.3 ml del tampón 2x HBS (50 mM HEPES pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄) y se incuba aproximadamente 30 min a temperatura ambiente. Pasados los 30 min se añade la mezcla de calcio con el DNA a las células, 16 h después se lavan las células con PBS y se las deja crecer en medio completo.

Para obtener células transfectadas de forma permanente con pEYFP-α-syn añadimos medio de selección conteniendo G418 sulfato. La selección se inició con una dosis de 0.8 mg/ml de geneticina durante la primera semana, decreciendo la dosis progresivamente durante 2 semanas hasta alcanzar la concentración 0.2 mg/ml. Los clones de las células resistentes se aislaron y se expandieron manteniendo la concentración de G418 a 0.2 mg/ml. La expresión de la proteína de fusión EYFP-α-syn en estas células fue analizada inicialmente por fluorescencia y posteriormente por SDS-PAGE al 10% e inmunodetectada con anticuerpos monoclonales anti-sinucleína en los extractos de células totales (obtenidos por lisis directa con tampón de carga SDS).

La transfección transitoria con varias construcciones de c-abl en pcDNA: c-abl, c-abl K290M y con c-abl SH3 en células PC12 establemente transfectadas con pEYFP-α-syn se realizó por el mismo método de cloruro cálcico detallado más arriba.

2.8 Marcaje metabólico de células en cultivo

Las células PC12 y CHO transfectadas establemente con pEYFP- α -syn a un 60-70% de confluencia fueron marcadas con 250 μ Ci/ml de 35 S Metionina/ Cisteína (Amersham Pharmacia) en medio DMEM sin metionina/cisteína (ICN) durante 60 min (pulso). Transcurrido este tiempo fueron lavadas con PBS e incubadas en medio completo sin marcaje en ausencia o en presencia de 25 μ M MG132 (Calbiochem) durante distintos periodos de tiempo entre 0 y 24 h. A los tiempos indicados de caza, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se lisaron en BIP-Ph con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 μ g/ml de pepstatina, 10 μ g/ml de leupeptina y 20 μ M MG132) manteniéndose en hielo 5 min. Los lisados se centrifugaron a 15.000 g a 4°C durante 30 min, se recogió el sobrenadante y se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-sinucleína previamente acoplados a Proteína A-Sefarosa. Tras inmunoprecipitar (Métodos 2.9) y analizar por SDS-PAGE al 10% se secaron los geles y se expusieron en el Instant Imager para cuantificar la radiactividad incorporada. Los valores obtenidos para cada tiempo de tres experimentos independientes se normalizaron respecto al tiempo 0 de caza. La vida media de EYFP- α -syn fue estimada ajustando los valores a una ecuación exponencial de primer orden.

2.9 Inmunoprecipitaciones

Los anticuerpos fueron acoplados a proteína-A Sefarosa por incubación de 15 μ l de suero de conejo con 20 μ l de proteína A-Sefarosa (Amersham Pharmacia) por incubación en TBS durante 2 h a temperatura ambiente con agitación rotacional. Los anticuerpos acoplados a la proteína A-Sefarosa se lavaron con BIP-Ph 5 veces centrifugando a 15.000 g 15 s y se incubaron con los sobrenadantes de los lisados celulares durante 3h a 4°C con agitación rotacional. Tras la incubación los inmunoprecipitados se centrifugaron a 15.000 g 15 s y se lavaron 3 veces con 1 ml de BIP-Ph, 2 veces con BIP-Ph con 2.4 M KCl y una vez más con agua destilada. Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron con tampón de carga SDS-NEM, se hirvieron 3 min y se analizaron por SDS-PAGE al 10%.

2.10 Inmunotinción celular y localización subcelular de proteínas por microscopía de fluorescencia confocal

En el estudio *in vivo* del efecto de la inhibición del proteasoma por MG 132 en los niveles de α -sinucleína se sembraron 5. 10⁵ células (CHO y PC12 transfectadas

permanentemente con EYFP- α -syn) sobre cubres en una placa de 24 pocillos (los cubres utilizados para sembrar PC12 fueron previamente tratados con 1mg/ml de poli-L-Lisina para facilitar su adhesión al cristal). Transcurridas 24 h añadimos medio nuevo con el inhibidor (o con DMSO como control) a las concentraciones indicadas, por periodos de 6 o 24 h. Los cubres se lavaron 3 veces con PBS a 4° C y se fijaron por incubación durante 10 min en 4 % paraformaldehído en PBS. Se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 en PBS durante 20 min. Los cristales se colocaron en una cámara humidificada y se bloqueó la posible unión inespecífica de los anticuerpo con PBS-BSA al 3% durante 10 min. Las células se incubaron durante 2 h con el anticuerpo policlonal anti-proteasoma a dilución 1/500 en PBS-BSA. Tras la incubación se lavaron con PBS (3 lavados de 5 min) y se incubaron con anticuerpo anti-Ig G de conejo conjugado a Alexa Fluor 594 a dilución 1/1000 en PBS-BSA conteniendo 1 μ M de DAPI durante 1h. Transcurrida esta incubación se lavaron 3 veces por 5 min con PBS. Los cubres se montaron en portaobjetos con Fluoromount-G (S. B.A.) y se observaron en el microscopio de fluorescencia confocal (Zeiss, Instituto Ramón y Cajal).

3 MATERIALES Y MÉTODOS ESPECÍFICOS PARA EL ESTUDIO DE AUTOANTICUERPOS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

3.1 Sueros humanos

Todos los pacientes cumplían el criterio de diagnóstico de EM y fueron clasificados en tres categorías: Recurrente-Remitente (RR), Progresiva-Secundaria (PS) y Progresiva-Primaria (PP) siguiendo el criterio diagnóstico establecido para las diferentes formas clínicas (Lublin y Reingold, 1996; McDonald y col., 2001). Sueros de 100 individuos sanos y de 40 pacientes con otras enfermedades neurológicas fueron utilizados como control. El diagnóstico de los pacientes con otras enfermedades neurológicas fue: ataxia cerebelosa (4 pacientes), neoplasia SNC (5), miastenia gravis (5), enfermedad cerebrovascular (6), neuropatía periférica (5), meningitis viral (2), polineuropatía (3) y síndrome de Guillain-Barre (10). También se estudiaron suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM cedidos amablemente por el Dr. W.W.Tourtelotte del National Neurological Specimen Bank. Esta investigación ha sido aprobada por el Comité Ético de los Hospitales participantes de acuerdo a la Declaración de Principios de Helsinki y se obtuvo el consentimiento previa información de todos los pacientes.

3.2 Determinación de isotipos de inmunoglobulinas

1-2 μ g de proteasoma purificado o 1 μ g de la subunidad recombinante indicada fueron separados por SDS-PAGE al 14% y teñido con azul de Coomassie, o transferido a nitrocelulosa para inmunoblot. La membrana fue incubada en tampón de bloqueo T-TBS-BSA durante 3 h, posteriormente fue incubada 3 h a temperatura ambiente con el suero o LCR de pacientes de EM o de individuos controles a una dilución 1/100 o 1/20, respectivamente (excepto en los casos indicados). Los filtros fueron revelados con anticuerpos de cabra anti-humano acoplados a fosfatasa alcalina a dilución 1/1000 como se ha descrito anteriormente. El isotipo de los autoanticuerpos fue determinado por revelado de los inmunoblots con anticuerpos contra Ig A, Ig G o Ig M acoplados a fosfatasa alcalina a dilución 1/5000.

3.3 Ensayos de proliferación de linfocitos

En una placa de 96 pocillos de fondo en U se pusieron 10^5 células mononucleares de sangre periférica sobre las que se ensayó proliferación por incubación durante 3 días en presencia de 10-20 $\mu\text{g/ml}$ de las correspondientes proteínas recombinantes purificadas. Las proteínas recombinantes utilizadas fueron: GST-C2Ct (antígeno) o GST (proteína control), ambas purificadas a partir de *E. coli* DH5 α en las mismas condiciones; C8 (antígeno) o EClpP (proteasa ClpP de *E. coli* utilizada como proteína control), ambas purificadas en las mismas condiciones a partir de células *E. coli* BL21 (Arribas y Castaño, 1993; Castaño y col., 1996). También se utilizó proteasoma purificado de hígado de rata como antígeno a una concentración de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ y glicoproteína de la mielina oligodendrocítica (MOG) a 5 $\mu\text{g/ml}$ en algunos ensayos. Fitohemaglutinina (1 $\mu\text{g/ml}$) fue usada como control positivo de proliferación y medio o tampón como control negativo de proliferación (Diaz-Villoslada y col., 1999). El índice de estimulación fue calculado como el cociente entre la media de cpms de tres cultivos en presencia de proteína antígeno y la media de cpms de tres cultivos en presencia de la proteína control, los valores de cpm obtenidos variaron entre 47 y 2000 cpm. Un índice de estimulación (SI) mayor de 2 fue considerado arbitrariamente positivo. No se encontró proliferación significativa (SI menor de 2) con muestras de 5 individuos sanos.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN DE α -SINUCLÉINA POR EL PROTEASOMA 20 S

1.1 El proteasoma 20S degrada α -sinucleína

Para comenzar el estudio de las proteinasas celulares responsables de la degradación de α -sinucleína se tomó un extracto soluble de hígado de rata y se cargó en una columna de intercambio iónico (DEAE-5PW-HPLC). Las proteínas fueron eluidas de la columna con un gradiente lineal de sal y alícuotas de cada fracción se ensayaron para degradación por incubación con $1\ \mu\text{g}$ de α -sinucleína a 37°C durante 2 h. En este ensayo se detectó un único pico de actividad proteolítica que eluía a 0.28 M sal coincidente con el pico de elución del proteasoma 20S, determinado por inmunodetección con anticuerpos específicos anti-C2 (ver Fig. 5).

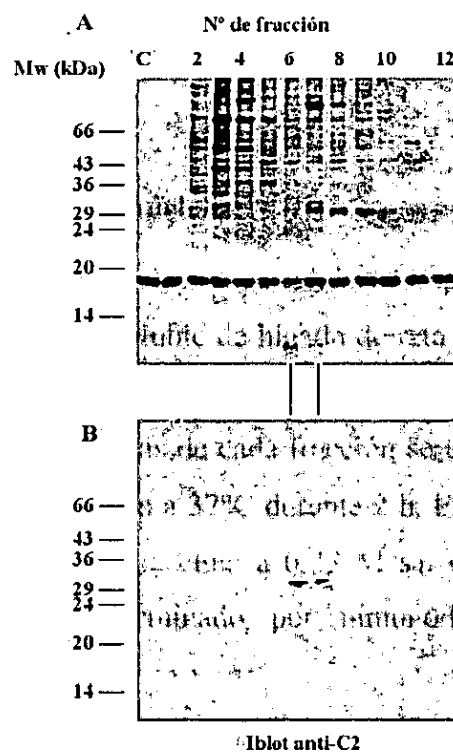


Figura 5. Perfil de elución de un extracto soluble de hígado de rata aplicado a una columna de DEAE-HPLC y ensayo de la actividad proteolítica frente a α -sinucleína. A, muestra el análisis por SDS-PAGE al 16%, teñido con azul de Coomassie del ensayo de degradación de α -sinucleína. El ensayo fue realizado por incubación de $1\ \mu\text{g}$ de α -sinucleína y $10\ \mu\text{l}$ de las fracciones eluidas de un DEAE-HPLC de la fracción soluble de hígado de rata (excepto el carril C, control) durante 1 h a 37°C como se describe en Materiales y Métodos 2.4. B, muestra el estudio por inmunoblot con anticuerpos contra la subunidad C2 del proteasoma de las mismas fracciones cuya actividad proteolítica sobre sinucleína se muestra en el panel A:

Las fracciones con el pico de actividad se juntaron y fueron sometidas a un análisis por gel filtración en una columna de HPLC TSK 5000. Alícuotas de las fracciones recogidas de la gel filtración fueron ensayadas para degradación de α -sinucleína como se ha descrito más arriba. De nuevo, un único pico de actividad fue detectado coincidente con el pico de elución del proteasoma 20S y presentaba una masa nativa estimada de 670 kDa, (datos no mostrados). Resultados similares se obtuvieron con la fracción soluble obtenida a partir de cerebro de rata. Estos resultados sugieren claramente que el proteasoma podría ser capaz de degradar α -sinucleína. Efectivamente, como muestra la Figura 6, el proteasoma 20S purificado es capaz de degradar α -sinucleína. La degradación de α -sinucleína es dependiente del tiempo de incubación y se inhibe por la presencia de MG 132 (Fig. 6).



Figura 6. Ensayo de degradación de α -sinucleína por proteasoma 20S en función del tiempo. Análisis de la degradación de α -sinucleína por proteasoma a diferentes tiempos (indicado en la parte superior de cada carril) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 16% y tinción con azul de Coomassie. Los carriles, No MCP y MCP + MG132, muestran los controles sin proteasoma o en presencia de proteasoma y 25 μ M del inhibidor del proteasoma MG132, respectivamente.

1.2 Constantes cinéticas de degradación de α -sinucleína silvestre y mutantes (A30P y A53T) por proteasoma

Dos variantes de α -sinucleína, A30P y A53T, han sido asociadas con formas familiares de PD de comienzo temprano, por tanto era interesante comparar la degradación por el proteasoma de α -sinucleína silvestre y la de estos dos mutantes puntuales. La Fig. 7

GST- α -sinucleína es degradada por proteasoma 20S (por inmunoblot con anticuerpos anti-GST o anti-sinucleína), mientras GST no es degradada en las mismas condiciones de ensayo.

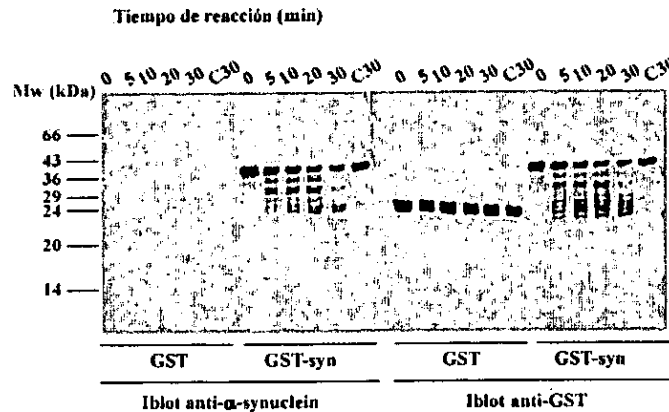


Figura 8. Degradación de la proteína de fusión GST- α -sinucleína y de GST en función del tiempo por proteasoma 20S. Ensayo de degradación de 1 μ g de GST- α -sinucleína o de GST por proteasoma a los tiempos indicados en la parte superior de cada carril. El análisis de la degradación se llevó a cabo por inmunodetección con los anticuerpos indicados (anti-sinucleína y con anti-GST). Los controles de degradación (carriles C) se realizaron en ausencia de proteasoma.

Estos resultados claramente demuestran que la secuencia de α -sinucleína es necesaria y suficiente para señalar a degradación a una proteína que por sí misma no es sustrato del proteasoma.

Para tratar de determinar las regiones de α -sinucleína requeridas para el reconocimiento por proteasoma, se construyeron dos tipos de mutantes de delección. Unos de ellos, GST-syn *StyI* y α -syn *StyI*, se obtuvieron por delección del fragmento *StyI*-*StyI* presente dentro de las repeticiones anfipáticas de la α -sinucleína. El otro tipo de mutantes de delección, GST- α syn C y α -syn stop109, se obtuvieron por delección de la región COOH terminal del cDNA tras corte con *Eco* R1 y por PCR con oligonucleótidos que introdujeron un codon de parada en la posición 109 de la sinucleína, respectivamente. Como se muestra en la Figura 9, la delección de cuatro (aminoácidos 11 al 45) de las siete repeticiones anfipáticas (que se extienden desde el aminoácido 7 al 87) afecta parcialmente a la degradación por el proteasoma. Se observa una disminución, entre el 20 y el 30% en la V_{max} (Fig. 9, panel de la derecha; ensayo a concentración 5 μ M), sin afectar la K_m que está próxima a 0.6 μ M. (Fig. 9, panel de la izquierda; ensayos a una concentración de 1 μ M).

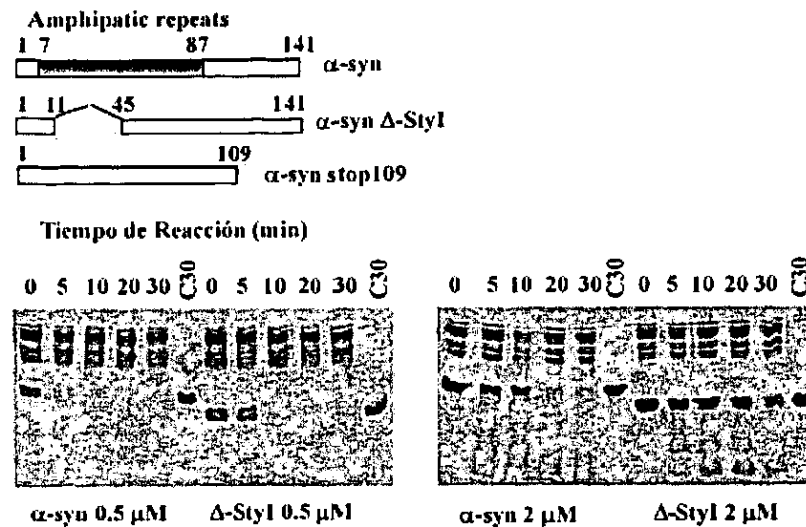


Figura 9. Estudio de las regiones de la secuencia de α -sinucleína requerida para ser degradada por el proteasoma 20S. Ensayos de degradación de α -sinucleína y α -syn StyI (el esquema de las construcciones se muestra en la parte superior) por proteasoma a los tiempos indicados, analizados por SDS-PAGE al 16% y teñidos con azul de Coomassie. Las cantidades utilizadas de α -sinucleína y α -syn StyI fueron concentraciones próximas a K_m y $V_{m\acute{a}x}$ de proteasoma. Los controles de degradación (C) se realizaron en ausencia del proteasoma.

Resultados similares fueron obtenidos con la proteína de fusión GST- α -syn StyI respecto a GST- α -syn (datos no mostrados). La delección del COOH terminal de la α -sinucleína (construcciones GST- α -syn C y α -syn stop109) no afecta a la degradación por proteasoma de las proteínas resultantes en comparación a la α -sinucleína silvestre. Estos resultados indican que el COOH terminal de sinucleína no es requerido para la degradación y que las repeticiones anfipáticas son requeridas para una mayor eficiencia en la degradación por proteasoma.

1.4 Subunidades del proteasoma implicadas en el reconocimiento de sinucleína

Para estudiar que subunidades del proteasoma están implicadas en el reconocimiento de α -sinucleína, se procedió a la obtención de sinucleína biotinilada para poder realizar los estudios de unión necesarios. La sinucleína biotinilada se detecta fácilmente tras transferencia a membranas por incubación con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina como se muestra en la Fig. 10A.

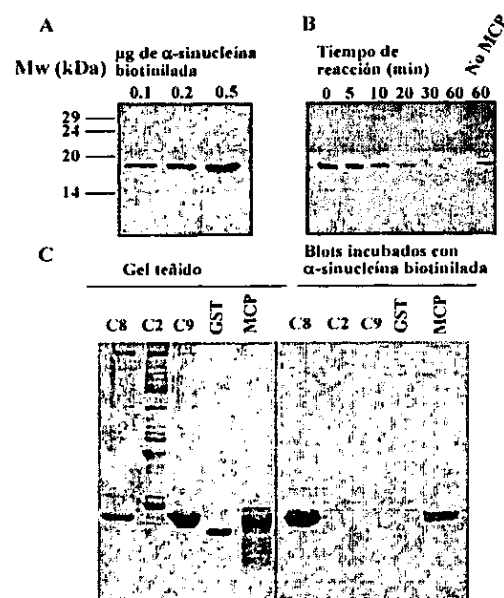


Figura 10. Identificación de las subunidades del proteasoma 20S que interaccionan con α -sinucleína. La obtención de α -sinucleína biotinilada y su detección por incubación con estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina en los Westernblots mostrados se describe en *Materiales y Métodos 2.3*. A, muestra un blot con distintas cantidades de α -sinucleína biotinilada. B, muestra un blot con la degradación de α -sinucleína biotinilada por el proteasoma 20S a los tiempos indicados en la parte superior de cada carril. C, muestra un análisis por SDS-PAGE al 16% y teñido con Coomassie de las subunidades recombinantes del proteasoma: C8, C2 y C9; GST y proteasoma. En el panel siguiente se muestra su correspondiente blot en el que se estudia la unión de α -sinucleína biotinilada por Far Western (como se describe en *Materiales y Métodos 2.3*) a las subunidades recombinantes del proteasoma y al proteasoma.

El siguiente paso fue demostrar que la biotinilación no afectaba a la degradación por el proteasoma, como se muestra en la Fig. 10B la sinucleína biotinilada es degradada por el proteasoma 20S de forma eficiente. Una vez caracterizada la sinucleína biotinilada se procedió al estudio de las subunidades del proteasoma que interactúan con la sinucleína mediante análisis por "Far Western" como se describe en *Materiales y Métodos 2.3.2*. Utilizando proteasoma purificado se obtuvo como resultado la unión de la sinucleína biotinilada a subunidades del proteasoma de 28-29 kDa (ver Fig. 10C, carril MCP). Para la identificación de la/s subunidad/es del proteasoma responsable/s se repitió el mismo tipo de ensayo de "Far Western", pero llevando además de proteasoma purificado subunidades recombinantes del proteasoma (C2, C8, C9) parcialmente purificadas y GST (como control). Los resultados mostrados en la Figura 10C permiten concluir que la sinucleína se une específicamente a la subunidad C8 del proteasoma de 28 kDa.

Varias construcciones de la subunidad C8 fueron usadas para tratar de encontrar la región de la subunidad C8 implicada en el reconocimiento de sinucleína, los resultados obtenidos por "Far Western" indicaban que el COOH-terminal de la subunidad de C8 estaba implicado (datos no mostrados). Como consecuencia se obtuvo una construcción de fusión de GST con la región COOH-terminal de la subunidad C8 (GST-C8Ct, GST fusionada al COOH-terminal de la subunidad C8 aminoácidos 190 a 255). La Figura 11A muestra que efectivamente GST-C8Ct es capaz de unir sinucleína, mientras que la sinucleína no se une a GST. Este resultado demuestra que la región COOH terminal de la subunidad C8 es capaz de unir sinucleína. Si esta interacción es suficientemente estable, cabría esperar que la proteína de fusión GST-C8Ct tendría que ser capaz de inhibir la degradación de sinucleína por el proteasoma. Antes de realizar estos experimentos, comprobamos que GST-C8Ct no es degradado por el proteasoma 20S (datos no mostrados). La Fig. 11B muestra que GST-C8Ct produce una inhibición de la degradación de α -sinucleína por el proteasoma 20S dependiente de la cantidad de GST-C8Ct añadida, mientras que GST no tiene efecto.

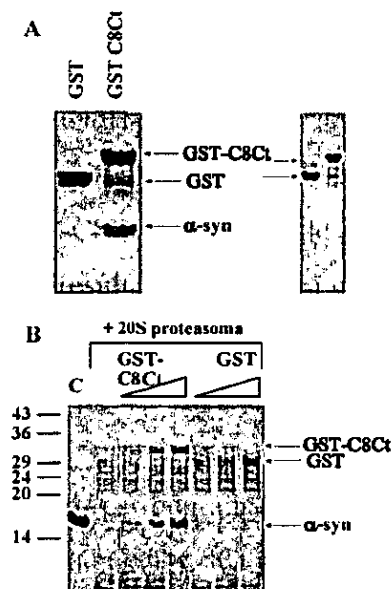


Figura 11. Ensayo de inhibición de la degradación de α -sinucleína por proteasoma con GST-C8Ct *in vitro*. A, muestra el análisis por SDS-PAGE al 16% del ensayo de unión de α -sinucleína a GST-C8Ct y a GST como control de unión inespecífica; a la derecha se muestra la movilidad electroforética y el grado de pureza de GST-C8Ct y GST utilizados en el ensayo en un gel de poliacrilamida al 16%. B, Ensayo de degradación realizado por incubación a 37 °C durante 30 min de 1 μ g de α -sinucleína con proteasoma (excepto en el carril C, control) y en los carriles indicados fueron añadidas cantidades crecientes de GST-C8Ct o de GST a la mezcla de reacción. El ensayo se analizó por SDS-PAGE al 16% y se tiñó con azul de Coomassie.

Estos resultados permiten concluir que la degradación de α -sinucleína por proteasoma es mediada por interacción con la subunidad C8 del proteasoma y que el reconocimiento parece tener lugar, al menos en parte, a través del COOH terminal de dicha subunidad.

1.5 Degradación de sinucleína en cultivos celulares

Para estudiar la degradación de sinucleína en células en cultivo, seleccionamos dos líneas celulares, CHO y PC12. CHO, una línea celular que no expresa niveles significativos de sinucleína endógena y cuyo origen es no neural (ovario); y PC12 línea celular dopaminérgica derivada de feocromocitoma adrenal de rata que expresa niveles bajos pero significativos de sinucleína. Otro de nuestros objetivos era el estudio de la localización subcelular de sinucleína, directamente por fusión de sinucleína a una proteína marcadora fluorescente. Dado que anteriormente hemos mostrado que GST- α -syn es degradada por proteasoma 20S, decidimos para abordar conjuntamente los dos objetivos anteriores realizar una construcción de fusión de α -sinucleína al COOH terminal de la proteína fluorescente amarilla (EYFP). Con esta construcción se obtuvieron varios clones de cada línea celular establemente transfectada; en la Fig. 12 se muestra una imagen de microscopía de fluorescencia confocal de un clon de cada una de las líneas celulares.

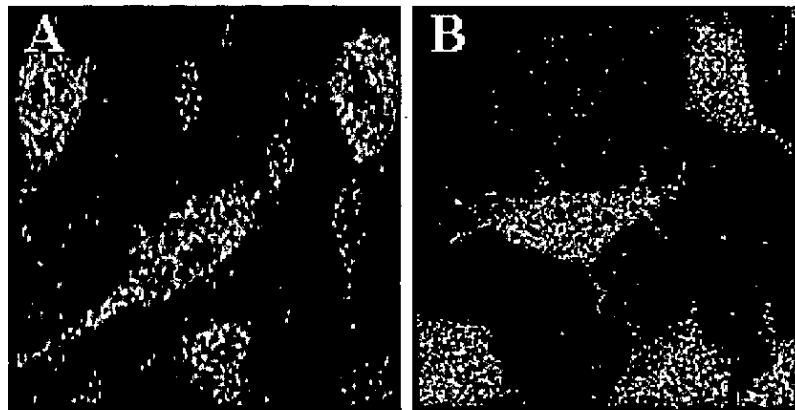


Figura 12. Localización subcelular de EYFP- α -syn por microscopía de fluorescencia. Células CHO (A) y PC12 (B) transfectadas establemente con pEYFP- α -syn donde la señal verde corresponde a la expresión de α -sinucleína fusionada a EYFP (proteína fluorescente verde-amarilla con un pico en el espectro de emisión a 527 nm).

La Fig. 13 A muestra los resultados obtenidos del análisis de expresión por inmunoblot con anticuerpos anti-sinucleína de dos clones diferentes de cada línea celular estudiada. La proteína de fusión, EYFP- α -sinucleína, tiene una movilidad electroforética correspondiente a una masa molecular aparente de 48 kDa en ambas células transfectadas, PC12 y CHO, que no está presente en las células control sin transfectar. Idéntico resultado se obtuvo cuando se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Clontech, datos no mostrados). Observamos también que la sinucleína endógena (con una masa molecular aparente de 19 kDa) se encuentra en PC12 transfectadas y sin transfectar, pero ausente en células CHO como cabría esperar.

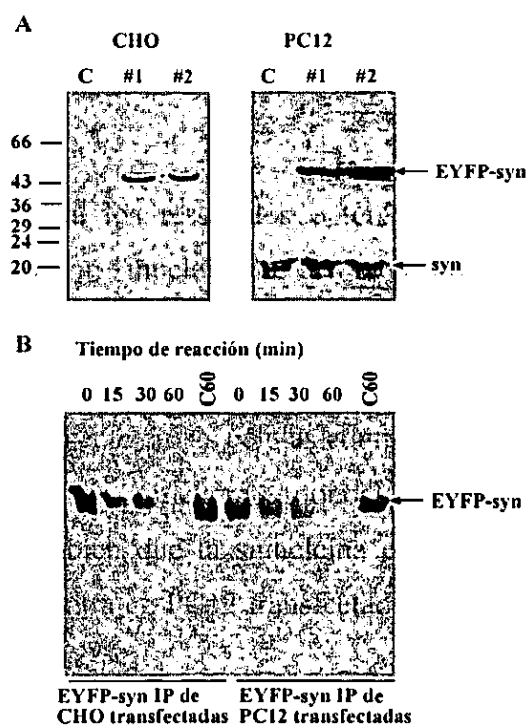


Figura 13. Detección de α -sinucleína en células CHO y PC12 transfectadas establemente con pEYFP- α -syn y ensayo de degradación de EYFP- α -syn por proteasoma.

A, Inmunodetección de α -sinucleína en lisados de células CHO y PC12 transfectadas con pEYFP- α -syn con anti-sinucleína. Los carriles #1 y #2 corresponden a dos clones de cada línea celular transfectadas y C (control) a células sin transfectar para cada línea celular, indicadas en la parte superior del panel. Todo se analizó por SDS-PAGE al 16% y posterior Iblot revelado por quioluminiscencia. **B**, Los lisados de estas células transfectadas fueron sometidas a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-sinucleína. Los inmunoprecipitados fueron incubados con el proteasoma a 37°C a los tiempos indicados en la parte superior de cada carril para ser ensayada su degradación. Los controles de degradación (C) fueron realizados en ausencia de proteasoma. Los productos de reacción fueron analizados por SDS-PAGE al 10%, inmunodetección usando anticuerpos anti-sinucleína y revelados por ECL.

El siguiente paso importante era demostrar si la proteína de fusión EYFP- α -sinucleína era sustrato del proteasoma 20S. Para este fin, EYFP- α -sinucleína fue inmunoprecipitada a partir de lisados celulares y analizada su degradación *in vitro* por proteasoma 20S purificado. La Figura 13 B muestra claramente la degradación en función del tiempo de la proteína de fusión EYFP- α -sinucleína inmunoprecipitada a partir de células transfectadas PC12 y CHO por incubación con el proteasoma.

Una vez mostrado que la proteína de fusión es sustrato del proteasoma 20S se abordó el estudio de la degradación de EYFP- α -sinucleína en las células transfectadas por experimentos de pulso-caza. Para este estudio células PC12 y CHO transfectadas establemente fueron sometidas a un pulso de 60 min con ^{35}S metionina/cisteína y posterior caza en medio completo en presencia o en ausencia de inhibidor del proteasoma (MG 132) a diferentes tiempos. Los lisados celulares fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-sinucleína, las proteínas inmunoprecipitadas analizadas por SDS-PAGE y autoradiografía.

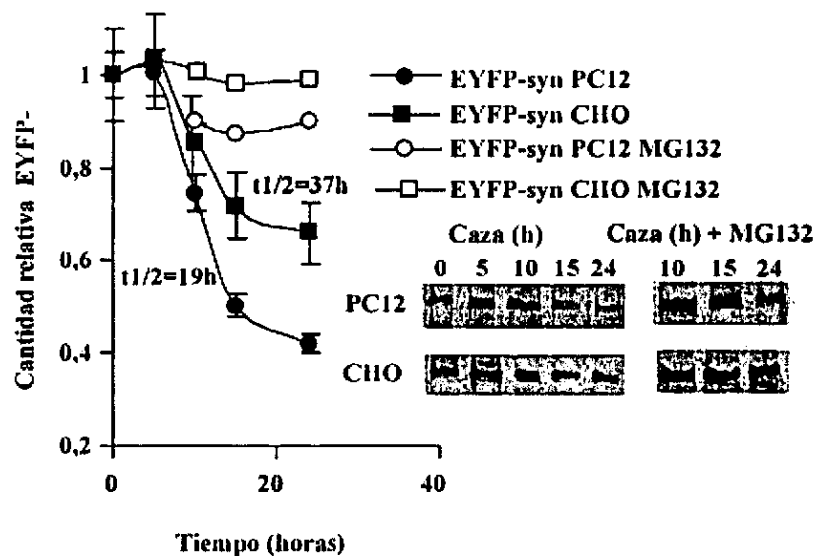


Figura 14. Estudio de síntesis y degradación de EYFP- α -syn por experimentos de pulso-caza en células transfectadas con pEYFP- α -syn. Células PC12 y CHO transfectadas con pEYFP- α -syn al 70% de confluencia fueron marcadas con $0.250\mu\text{Ci/ml}$ [^{35}S] metionina/cisteína durante 60 min. Transcurido este tiempo se recoge el pulso y se añade medio completo con o sin $25\mu\text{M}$ del inhibidor del proteasoma MG132 y se caza a los tiempos indicados. Las células fueron procesadas por inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-sinucleína. Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron con tampón de carga NEM-SDS y se analizaron por SDS-PAGE al 10%. Los ensayos se hicieron por triplicado y la media de los valores obtenidos de la cuantificación para cada tiempo \pm SD, normalizados respecto tiempo 0 de caza, son mostrados en la gráfica junto con el correspondiente autorradiograma.

Un autorradiograma de uno de estos experimentos de pulso-caza se muestra en la Fig. 14. Posteriormente se cuantificó la radiactividad presente en EYFP- α -sinucleína para cada tiempo (InstantImager) y los valores obtenidos fueron normalizados respecto al tiempo 0 de caza. Para el cálculo de la vida media los valores fueron ajustados a una ecuación exponencial de primer orden, obteniéndose un coeficiente de regresión $R^2_{(PC12)}$: 0.92 y $R^2_{(CHO)}$: 0.88. Como se muestra en la Fig. 14, la vida media estimada para EYFP- α -sinucleína en PC12 es de 19 ± 1 h y de 37 ± 2 h en CHO. Esta degradación de EYFP- α -sinucleína es inhibida en ambas líneas celulares por la presencia durante la caza de MG 132. Estos resultados indican que la EYFP- α -sinucleína recién sintetizada es degradada por proteasoma, y su velocidad de degradación es mayor en PC12 que en CHO.

El siguiente paso fue estudiar el posible efecto que sobre los niveles de EYFP- α -sinucleína en estado estacionario pudiera tener la inhibición de la actividad del proteasoma. Con este objetivo, células PC12 y CHO transfectadas establemente fueron tratadas durante diferentes tiempos (6 y 24 h) con 25 μ M MG132 (o con DMSO como control). Lisados totales de las células fueron analizados por SDS-PAGE al 10% y posterior inmunoblot con anticuerpos anti-sinucleína (Figura 15).

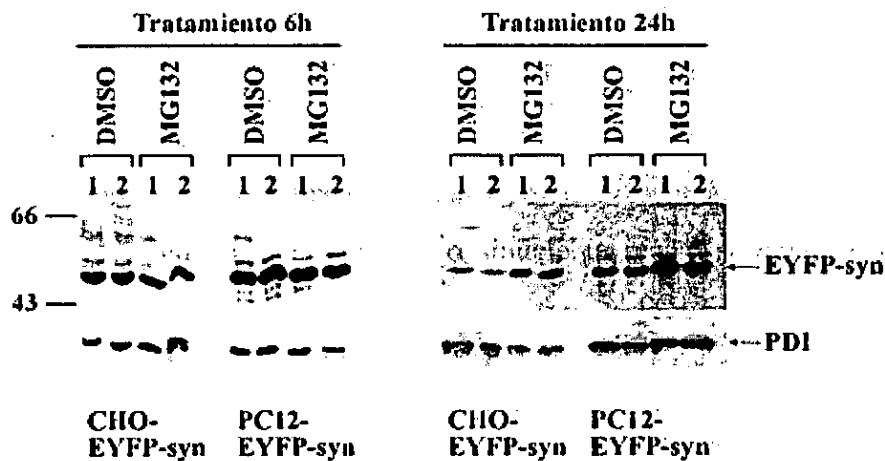


Figura 15. Efecto de la inhibición del proteasoma por MG 132 en células transfectadas con pEYFP- α -syn. Análisis por SDS-PAGE al 10% y posterior inmunoblot con anticuerpos anti-sinucleína de lisados de células CHO y PC12 establemente transfectadas con pEYFP- α -syn y tratadas con inhibidor de proteasoma. El revelado fue por quimioluminiscencia y se utilizaron anticuerpos policlonales anti-PDI como control de normalización. El ensayo de inhibición se realizó con 25 μ M del inhibidor del proteasoma MG 132 o con DMSO como control negativo durante periodos de 6 o 24 h.

El tratamiento durante 6 h con MG132 no tenía efecto en los niveles de EYFP- α -syn y tras 24 h de tratamiento había un pequeño incremento de EYFP- α -sinucleína (1,2 veces aproximadamente) en ambas líneas celulares en estudio. Dosis más bajas de MG132 (5 μ M) no tuvieron ningún efecto sobre los niveles de EYFP- α -sinucleína y dosis más altas (50 μ M) resultaban tóxicas provocando una extensiva muerte celular por apoptosis. Cuando estas células tras el tratamiento con MG132 (25 μ M durante 24h) fueron analizadas por microscopía de fluorescencia confocal, se observó la aparición de agregados fluorescentes en el interior de su citoplasma, como se muestra en la Figura 16 D, E y F, mientras que estos agregados estaban ausentes en células control (Fig. 16 A, B y C). Cuando se estudió la localización del proteasoma en estas células (Figura 16E) se encontró que esos agregados intracitoplásmicos de EYFP- α -sinucleína también contenían proteasoma.

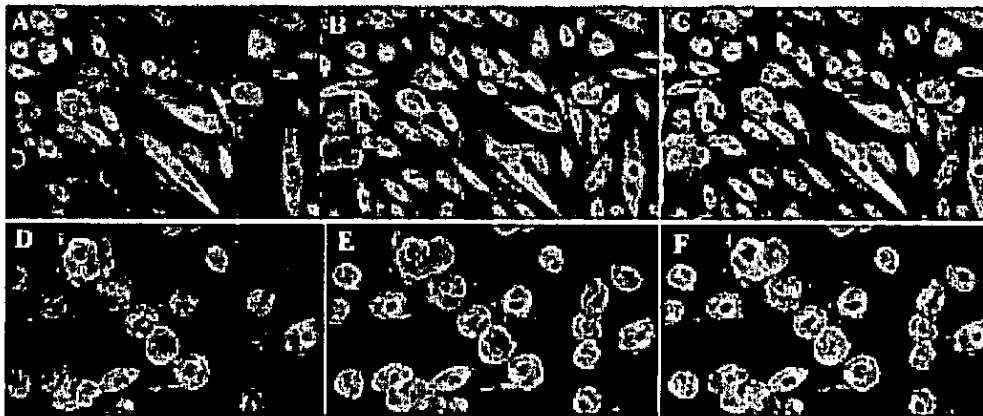


Figura 16. Tratamiento con el inhibidor del proteasoma, MG 132, en células transfectadas con pEYFP- α -syn de forma estable. Microscopía de fluorescencia de células CHO que sobre expresan de forma estable EYFP- α -syn tratadas durante 24 h. A, B y C con DMSO como control o con 25 μ M del inhibidor de proteasoma, MG 132 (D, E y F). La fluorescencia verde es debida a la proteína EYFP fusionada a α -sinucleína (EYFP- α -syn) marcando su localización (A y D). B y E inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal anti-proteasoma. La tinción roja con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 marca la localización de MCP. C y F, indicado en amarillo, la localización de EYFP- α -syn y proteasoma.

1.6 Modificaciones post-traduccionales de α -sinucleína

La larga vida media de la α -sinucleína encontrada en los experimentos *in vivo* indicaba que algún mecanismo estaba operando en las condiciones celulares que prevenía la degradación de la α -sinucleína. Una posibilidad era que la α -sinucleína sufriera modificaciones post-traduccionales *in vivo* y que naturalmente no están presentes en la sinucleína recombinante que utilizamos en los ensayos de degradación *in vitro*.

En el momento de empezar este estudio se había descrito por análisis en geles bidimensionales que α -sinucleína *in vivo* presentaba varias isoformas con diferentes puntos isoeléctricos (Zugaro y col., 1998) y se había caracterizado que la Ser 118 de β -sinucleína era un potencial sitio de fosforilación por calmodulina-quinasa II (Nakajo y col., 1993). El análisis de posibles sitios de fosforilación utilizando la base de PROSITE indicó la existencia de varios posibles sitios de fosforilación por CKI y CKII y un putativo sitio de fosforilación por proteínas tirosina quinasa. Estos datos sugerían la posibilidad de que α -sinucleína pudiera ser sustrato de proteína quinasa. Adicionalmente era interesante estudiar si los mutantes de α -sinucleína, A30P y A53T, diferían respecto a la forma silvestre en su susceptibilidad a la fosforilación por diferentes proteínas quinasa. El esquema de las construcciones utilizadas para delimitar las regiones de α -sinucleína potencialmente fosforilables se muestran en la Fig. 17A y el análisis por SDS-PAGE de las proteínas recombinantes purificadas se muestra en la Fig. 17B. La estrategia seguida para el diseño de estas construcciones se basó en el estudio de la secuencia de sinucleína y de los posibles sitios de fosforilación para tirosina, dado el gran número de Ser/Thr que contiene la secuencia de α -sinucleína. Como se presenta en la figura 17 se diseñaron dos tipos de construcciones tanto con α -sinucleína como con la proteína de fusión GST- α -sinucleína: un tipo de construcción se obtuvo por delección del COOH terminal donde se localizan 3 de las 4 tirosinas de α -sinucleína, (syn stop109 y GST-synC t) respectivamente, y un tipo de construcción ya mostrada en los ensayos de degradación en la que se deleccionó una pequeña región que contenía exclusivamente la Y 39, syn StyI y GST-syn StyI. Por otro lado y dado el pequeño tamaño de la región COOH-terminal de α -sinucleína, este trozo de la proteína se obtuvo como proteína de fusión con GST (GST-COOH-syn).

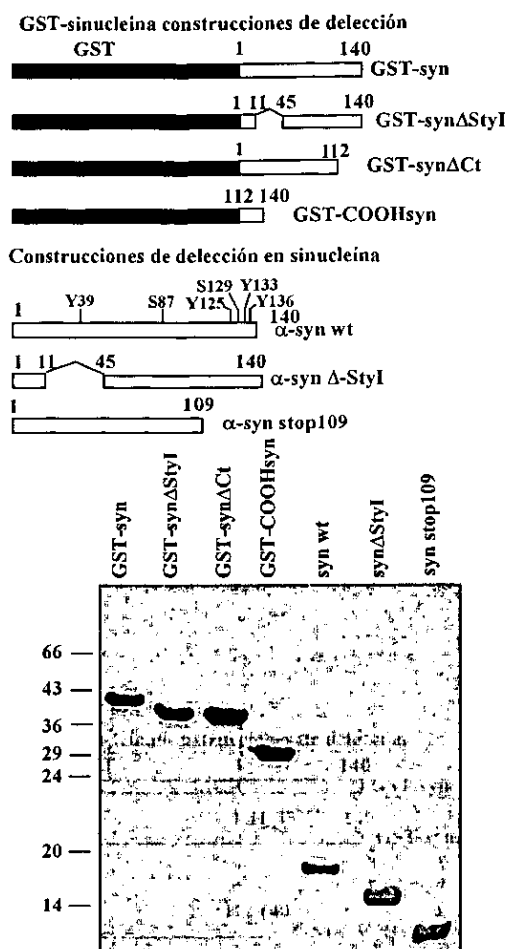


Figura 17. Construcciones de deleción de sinucleína y GST- α -sinucleína utilizadas para determinar posibles sitios de fosforilación. A, Esquema de las construcciones de GST- α -syn y de α -sinucleínas utilizadas para el estudio de sitios de fosforilación por diferentes proteínas quinasas. B, Gel al 18% teñido con Coomassie de aproximadamente 1 μ g de cada una de las diferentes construcciones de α -sinucleína y GST- α -sinucleína

1.7 Estudios de fosforilación de α -sinucleína *in vitro* por Caseína quinasas I y II

Las serina/treonina quinasas CKI y CKII fueron obtenidas como se describe en Materiales y Métodos 1.4 y se ensayó su capacidad de fosforilación *in vitro* sobre α -sinucleína. Ambas quinasas fueron capaces de fosforilar α -sinucleína. Para determinar los posibles sitios de fosforilación utilizamos las construcciones de fusión GST- α -syn mostradas en la Fig. 17. Un experimento representativo para ambas quinasas se muestra en la Figura 18A. Los resultados muestran que GST- α -syn y GST- α -syn Sty se fosforilan por ambas quinasas, mientras que la construcción obtenida por deleción del carboxilo terminal (GST-syn Ct) no se fosforila. En concordancia con estos resultados la proteína

de fusión GST-COOH-syn es fosforilada por ambas quinasas. Estos resultados nos indican que la fosforilación por ambas quinasas debe ocurrir esencialmente en la región carboxilo terminal de sinucleína.

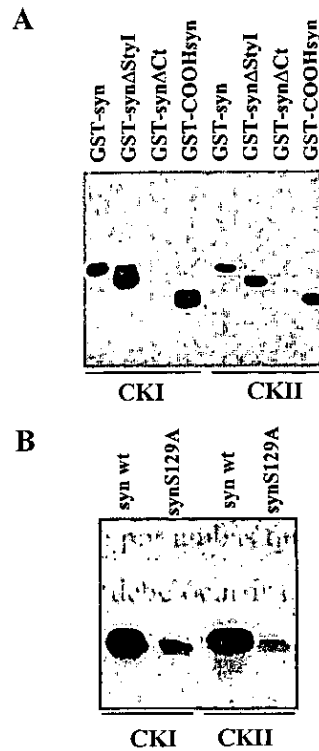


Figura 18. Estudio del sitio de fosforilación de α -sinucleína por CKI y CKII. A, muestra la autorradiografía del análisis por SDS-PAGE al 12% de un ensayo de la fosforilación de 1 μ g de las construcciones de GST- α -syn (indicadas en la parte superior de los carriles) por CKI y CKII. El procedimiento detallado se describe en Materiales y Métodos 2.5. B, muestra un análisis similar de la fosforilación con las mismas quinasas indicadas siendo los sustratos utilizados α -sinucleína silvestre (α -syn wt) y el mutante puntual S129A de sinucleína.

Dentro de esa región carboxilo terminal sólo se encuentra un aminoácido susceptible de fosforilación por CKI o CKII, la serina en posición 129. Por tanto se obtuvo el mutante puntual S129A sinucleína y ensayamos su fosforilación por ambas quinasas en comparación con sinucleína silvestre. Como se muestra en la figura 18B, el nivel de fosforilación de syn S129A disminuye drásticamente respecto al nivel de fosforilación de sinucleína silvestre, siendo esta reducción en la fosforilación más extensiva para CKII que para CKI (nótese que el autoradiograma mostrado está claramente sobre expuesto). Estos resultados nos indican que S 129 es el sitio de fosforilación preferencial tanto para CKI como para CKII, aunque pueden existir otros sitios minoritarios.

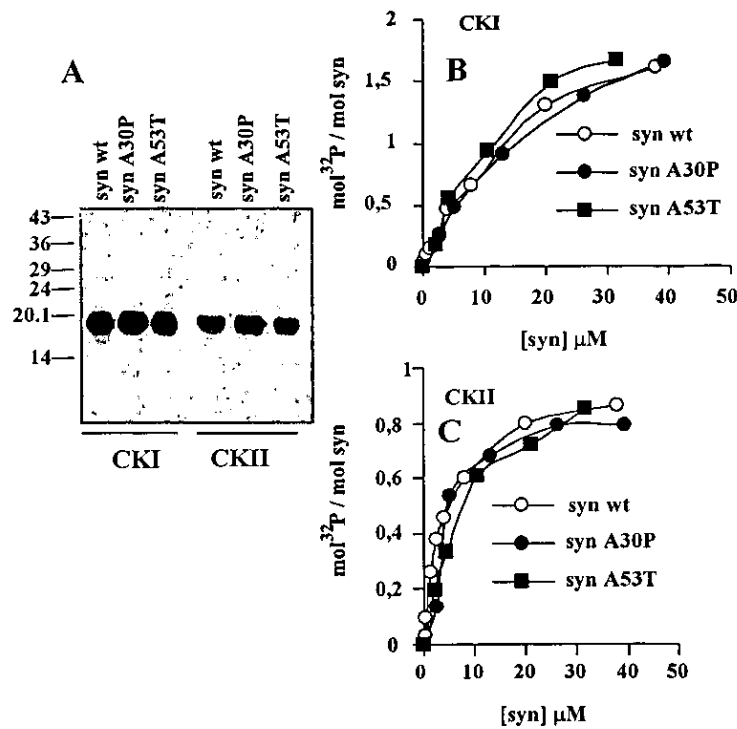


Figura 19. Fosforilación de α -sinucleína silvestre, A30P y A53T por CKI y CKII. A, muestra una autorradiografía del análisis por SDS-PAGE al 16% de ensayo de fosforilación de 1 μ g de las α -sinucleínas silvestre, A30P y A53T por CKI y CKII (el procedimiento se detalla en Materiales y Métodos 2.5). B y C, presentan la estequiometría de fosforilación de α -sinucleína wt, A30P y A53T por CKI y CKII, respectivamente

Para ver si las mutaciones A30P y A53T tenían algún efecto sobre la fosforilación por CKI y por CKII, comparamos la fosforilación de α -sinucleína silvestre, y de los dos mutantes por ambas quinasas. La figura 19 muestra un autoradiograma representativo de los resultados obtenidos y como puede observarse no se encontraron diferencias significativas de fosforilación de los mutantes respecto a sinucleína silvestre. Para estudiar si podría haber un cambio en afinidad o en la estequiometría de fosforilación, realizamos una curva de dosis para cada una de las proteínas α -sinucleína silvestre, α -sinucleína A30P y A53T con ambas quinasas. La Fig. 19B muestra las curvas de dosis obtenidas tras la cuantificación de la radiactividad incorporada. Las K_m aparentes para sinucleína silvestre y para los dos mutantes no son significativamente diferentes (en torno a 5 μ M) y la estequiometría es también similar. Cabe destacar que mientras la estequiometría de fosforilación máxima por CKII es próxima a 1, la estequiometría máxima de fosforilación por CKI tiende a ser próxima a 2. Estos resultados concuerdan con los resultados

mostrados en la Fig. 18B, indicando que CKII fosforila un único sitio (S129) y que CKI probablemente fosforila 2 sitios, uno de los cuales y mayoritario es también S129.

1.8 Estudios de fosforilación de α -sinucleína *in vitro* por proteína tirosina quinasas, c-src y c-abl

En el estudio de fosforilación por proteína tirosina quinasas (PTKs) decidimos utilizar c-src y c-abl dado que representan prototipos de PTKs periféricas de membrana e involucradas en la transducción de señales. La α -sinucleína era fosforilada *in vitro* por c-src y por tanto el primer abordaje fue la localización de la región fosforilada. Las construcciones mostradas en la figura 17 fueron ensayadas como sustrato de c-src y un autoradiograma representativo de los resultados obtenidos se muestra en la Fig. 20A. Los resultados obtenidos indican que los sitios de fosforilación por c-src deben estar localizados en el COOH terminal de la sinucleína, puesto que su delección (GST-syn C y syn stop109) suprime totalmente la fosforilación y la construcción de fusión GST con el COOH terminal de sinucleína es fosforilada por c-src. Para determinar la Tyr del COOH terminal que era fosforilada por c-src, se obtuvieron mutantes puntuales (Y por F) de las 4Y de la α -sinucleína silvestre. Los resultados se muestran en la Figura 20B y la cuantificación del grado de fosforilación de los diferentes mutantes en la Fig. 20C. La mutación puntual Y39F no afecta significativamente a la fosforilación por c-src lo que era de prever en base a los resultados mostrados en la Fig. 20A, ya que GST-syn S ty y syn S ty (que tienen deleccionada la Y39) se fosforilan de forma similar a las construcciones que expresan la sinucleína completa. La mutaciones Y125F e Y133F disminuyen el grado de fosforilación en un 60% respecto a la sinucleína silvestre, mientras que la mutación Y136F no afecta el grado de fosforilación por c-src. Para confirmar que las Y 125 y 133 eran los sitios principalmente fosforilados por c-src, se realizó un estudio de fosforilación de dobles mutantes Y39F mas Y125 ó 133 ó 136F, los resultados obtenidos (Fig. 20B y C) son equivalentes a los mostrados con la mutación puntual de cada una de las tirosinas por separado. Finalmente realizamos el estudio de dos triples mutantes Y39, 125, 133F que prácticamente resulta en la supresión de la fosforilación y Y39, 125, 136F cuyo nivel de fosforilación por c-src se reduce un 60% respecto a la forma silvestre como cabría esperar de los resultados obtenidos con el mutante puntual Y125F. En conclusión Y 125 y 133 del

COOH terminal de sinucleína parecen ser los dos sitios predominantes de fosforilación por c-src.

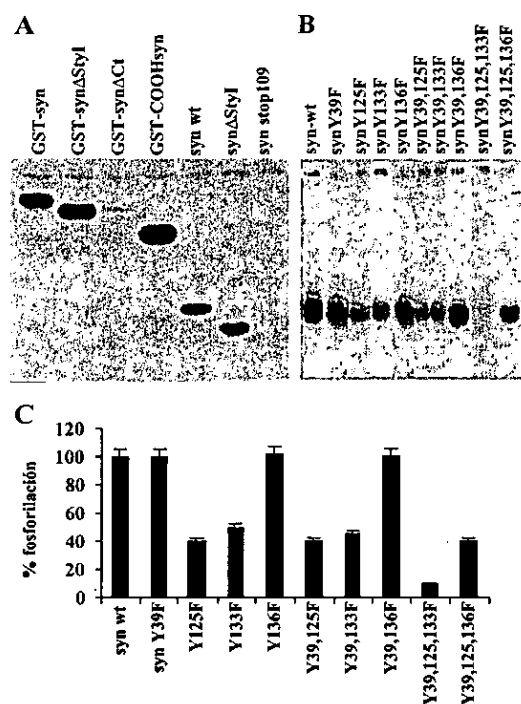


Figura 20. Estudio del sitio de fosforilación de α -sinucleína por c-Src. Los sitios de fosforilación de α -sinucleína por c-Src se estudiaron por ensayo de fosforilación in vitro de diferentes construcciones de α -sinucleína bien como proteína de fusión con GST o de α -sinucleína silvestre, como se indica en los respectivos carriles (A). El mapeo fino se llevó a cabo por estudios de fosforilación de mutantes puntuales (Y a F) de α -sinucleína como se indican en los respectivos carriles del panel B. Las reacciones de fosforilación se analizaron por SDS-PAGE al 18% y autoradiografía. C, muestra la cuantificación de la fosforilación en tanto por ciento (\pm SD, n=3) de los distintos mutantes puntuales (Y/F) respecto a la α -sinucleína silvestre (100%).

El estudio de la fosforilación por c-src de los mutantes α -syn A30P y A53T se muestra en la Fig. 21. El autoradiograma de la Fig. 21A muestra que el grado de fosforilación de los mutantes es similar al de sinucleína silvestre. También la K_m ($5\mu M$) y la estequiometría de fosforilación por c-src es similar para las tres sinucleínas. La estequiometría de fosforilación para las tres sinucleínas es similar (0,25 moles/mol de sinucleína).

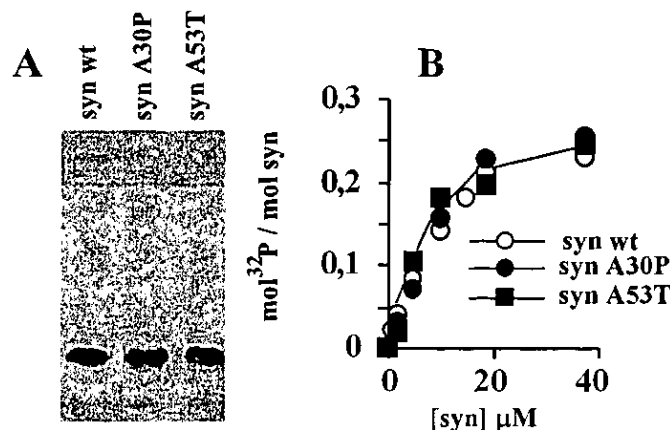


Figura 21. Fosforilación de α -sinucleína silvestre, A30P y A53T por c-Src. A, muestra una autorradiografía del análisis por SDS-PAGE al 16% de los productos obtenidos en el ensayo de fosforilación de $1\mu\text{g}$ de las α -sinucleínas silvestre, A30P y A53T por c-Src (según el procedimiento detallado en Materiales y Métodos 2.5). B, muestra la estequiometría de fosforilación de α -sinucleína silvestre, A30P y A53T.

De igual forma se abordó el estudio de la fosforilación de sinucleína por c-abl. Tras comprobar que la sinucleína era fosforilada *in vitro* por c-abl se realizaron experimentos de fosforilación de las diferentes construcciones de delección. Los resultados se muestran en la figura 22A. Todas las construcciones son fosforiladas por c-abl con similar eficiencia a excepción de aquellas que tienen la delección Sty. Estos resultados parecen indicar que c-abl fosforila sinucleína en la Y39 principalmente. Sin embargo, resulta sorprendente que c-abl fosforile la construcción GST- α -syn Ct, cuando los resultados de la delección del COOH terminal tanto en sinucleína (syn stop 109) como en la construcción de fusión con GST (GST-syn Ct) muestran un nivel de incorporación de ^{32}P muy similar al obtenido con la sinucleína entera. Por otro lado se muestra en la misma figura 22A la fosforilación por c-abl de un sustrato de c-abl bien caracterizado, GST-Crk. La incorporación de ^{32}P por c-abl en sinucleína es aproximadamente el 40% de la incorporación en GST-Crk en idénticas condiciones de reacción, lo que nos indica que sinucleína no es un sustrato marginal para c-abl.

Para localizar de forma más precisa los sitios de fosforilación por c-abl se realizó el mismo tipo de ensayo utilizado para c-src. Los resultados se muestran en la Fig. 22B y su cuantificación relativa en la Fig. 22C.

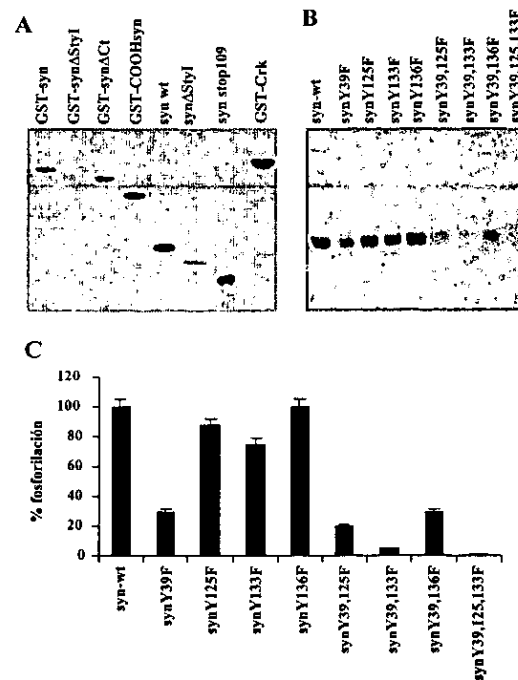


Figura 22. Estudio de los sitios de fosforilación de α -sinucleína por c-abl. Las reacciones de fosforilación de las distintas construcciones GST- α -sinucleína y de α -sinucleína se analizaron por SDS-PAGE al 18% y autorradiografía. A, autorradiograma de la fosforilación por c-abl de las construcciones indicadas en la parte de arriba de cada carril. GST-Crk se utiliza como sustrato control de fosforilación. B, muestra el ensayo de fosforilación realizado sobre los mutantes puntuales de α -sinucleína (Y/F) indicados encima de cada carril utilizados para determinar las tirosinas fosforiladas por c-abl. C, muestra la cuantificación de la fosforilación de los distintos mutantes puntuales (Y/F) en tanto por ciento (\pm SD, n=3) respecto a α -sinucleína silvestre (100%) mostrados en el panel B.

Como cabría esperar de los resultados obtenidos con las construcciones de delección, la mutación puntual Y39F en la sinucleína produce una disminución en la fosforilación de un 75%. Las mutaciones Y125F e Y133F hacen disminuir un 10% y un 25% la incorporación de 32 P, respectivamente, mientras que la mutación Y136F no afecta a la fosforilación por c-abl. Los resultados obtenidos con los dobles mutantes (Y39,125F), (Y39,133F) e (Y39,136F) sugieren de nuevo que c-abl fosforila fundamentalmente Y 39, 125 y 133. Esta conclusión se ratifica por la ausencia total de fosforilación por c-abl del triple mutante Y39,125,133F de sinucleína.

Seguidamente se analizó la fosforilación por c-abl de la sinucleína silvestre y de los dos mutantes A30P y A53T. Los resultados se muestran en la Fig. 23A y la estequiometría de fosforilación en la Fig. 23B.

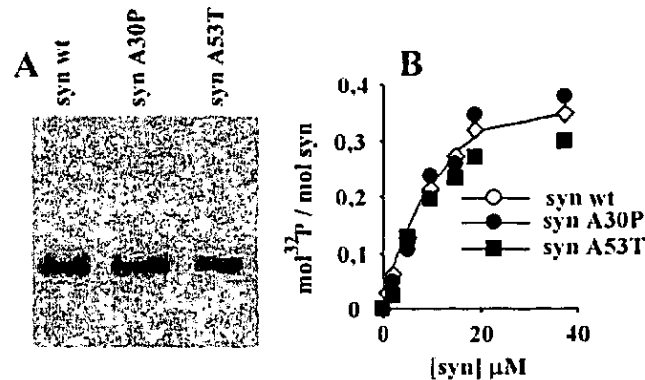


Figura 23. Fosforilación de α -sinucleína silvestre, A30P y A53T por c-Abl. A, muestra una autorradiografía del análisis por SDS-PAGE al 16% del ensayo de fosforilación de 1 μ g de las α -sinucleínas silvestre, A30P y A53T por c-Abl (según el procedimiento detallado en Materiales y Métodos 2.5). B, muestra la estequiometría de fosforilación de α -sinucleína silvestre, A30P y A53T.

Estos resultados demuestran que las mutaciones puntuales A30P y A53T no afectan a la fosforilación de la sinucleína por c-abl, tanto la K_m como la estequiometría máxima de fosforilación es similar para la sinucleína silvestre y para los dos mutantes.

1.9 Estudios de fosforilación *in situ* de α -sinucleína por c-abl

El siguiente paso obvio era demostrar si la sinucleína se podría fosforilar *in vivo* por las proteína quinasas que habíamos mostrado ser capaces de fosforilarla *in vitro*. Como ocurre algunas veces, se publicaron sendos trabajos que mostraban la fosforilación *in vivo* de sinucleína por CKI y CKII (Okochi y col., 2000) y la fosforilación de sinucleína *in vivo* por c-src (Ellis y col., 2001). Dados estos resultados nos quedaba por mostrar la posible fosforilación por c-abl. Para este fin se utilizaron células transfectadas establemente con pEYFP- α -syn y se transfectaron transitoriamente con varias construcciones de c-abl en pcDNA: c-abl, c-abl K290M (mutante inactivo) y c-abl SH3 (mutante activo por la delección del dominio SH3 de la quinasa). Tras la transfección se prepararon los correspondientes lisados celulares y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti- α -sinucleína. Los inmunoprecipitados se analizaron por SDS-PAGE al 10% y tras transferencia se realizó una doble inmunodetección con anticuerpos anti-sinucleína y anti-fosfotirosina. La Fig. 24 muestra los resultados obtenidos.

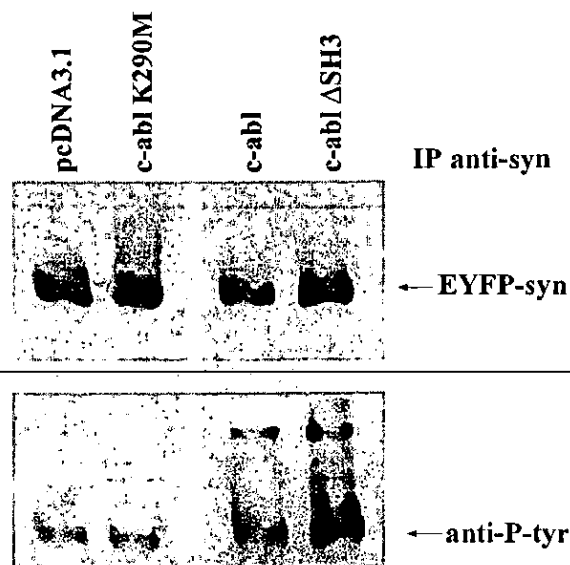


Figura 24. Fosforilación de EYFP- α -sinucleína por c-Abl *in vivo*. Células PC12 transfectadas establemente con pEYF- α -syn y transitoriamente con varias construcciones de c-abl, en pcDNA: c-abl, c-abl K290M, c-Abl SH3; y con el vector vacío como control. Las células fueron recogidas con tampón de inmunoprecipitación conteniendo inhibidores de proteasas y se inmunoprecipitaron con anti-sinucleína. Se analizó por SDS-PAGE al 10% y posterior inmunodetección usando anticuerpos anti-fosfotirosina y revelado por ECL.

La cantidad de sinucleína inmunoprecipitada de las diferentes transfecciones es similar (Fig. 24 panel superior), sin embargo el nivel de fosforilación de sinucleína (Fig. 24, panel inferior) aumenta con la transfección de c-abl y es mucho mayor cuando se transfecta la forma constitutivamente activa de c-abl (c-abl SH3). Este aumento en el contenido de fosfotirosina es debido a c-abl puesto que la transfección con una forma de c-abl sin actividad quinasa (c-abl K290M) no produce cambio en el contenido en fosfotirosina en EYFP-sinucleína respecto a la basal. Experimentos control con EYFP muestran que la proteína fluorescente no es fosforilada por la transfección por c-abl o c-abl SH3 (datos no mostrados). Estos resultados permiten concluir que c-abl es capaz de fosforilar α -sinucleína tanto *in vitro* como en las condiciones celulares.

1.10 Efecto de la fosforilación de sinucleína sobre la degradación por proteasoma 20S.

El siguiente objetivo fue estudiar el posible efecto que la fosforilación de la sinucleína por diferentes proteína quinasas podría tener sobre la degradación de sinucleína por proteasoma. Para este estudio se procedió a la fosforilación de sinucleína silvestre y de

los dos mutantes, A30P y A53T, por CKI, CKII, c-src y c-abl. Las sinucleínas fosforiladas fueron después sometidas a reacciones de degradación por proteasoma 20S *in vitro* y posterior cuantificación de la degradación en el tiempo. La dependencia con el tiempo de la degradación de sinucleína y de los dos mutantes tras fosforilación por CKII se muestra en la Fig. 25B. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en la velocidad de degradación de sinucleína y de los dos mutantes tras la fosforilación por CKII. Resultados similares se obtuvieron tras la fosforilación por CKI (Fig. 25A), aunque en este caso parece que sinucleína A30P fosforilada por CKI presenta un enlentecimiento en la degradación en comparación con sinucleína silvestre y A53T fosforiladas por CKI.

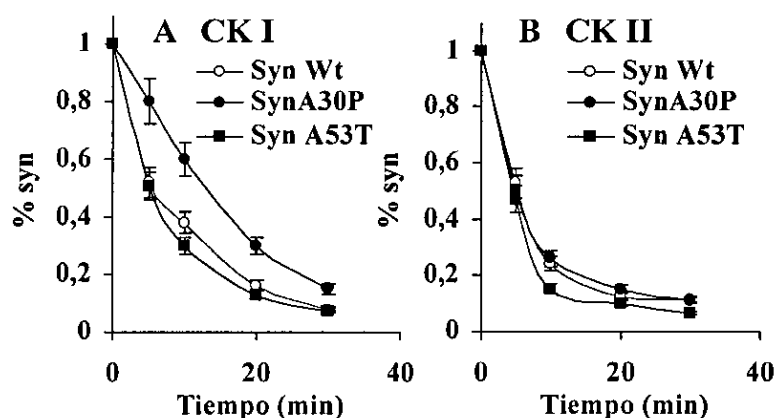


Figura 25. Degradación por proteasoma 20S de sinucleína, A 30P y A 53T fosforiladas por CKI y CKII. Sinucleína silvestre, A 30P y A 53T fueron fosforiladas *in vitro* por CKI (A) y CKII (B). Las sinucleínas fosforiladas fueron incubadas con proteasoma durante los tiempos indicados y los productos de reacción se analizaron por SDS-PAGE al 16% y autorradiografía. Los gráficos son el resultado de la cuantificación de la radiactividad (\pm SD; n=3), presente en la sinucleína intacta a lo largo del tiempo de incubación, referidos al valor obtenido a tiempo 0.

El efecto de la fosforilación de las tres sinucleínas por c-src y c-abl sobre la degradación por proteasoma se muestra en la Figura 26A y B, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que la velocidad de degradación de sinucleína, A30P y A53T fosforiladas por c-src son similares, aunque la velocidad de degradación de A53T fosforilada por c-src es ligeramente más rápida.

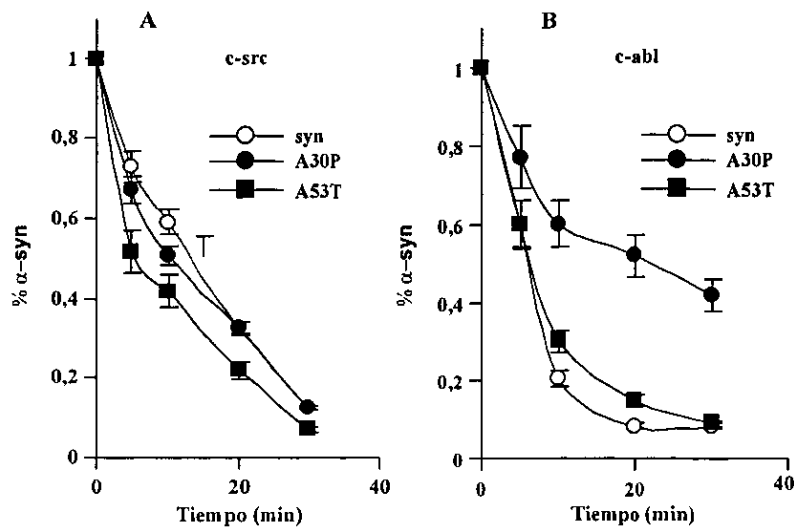


Figura 26. Degradación por proteasoma 20S de sinucleína, A30P y A53T fosforiladas por *c-src* y *c-abl*. Sinucleína silvestre, A30P y A53T fueron fosforiladas *in vitro* por *c-src* (A) y *c-abl* (B). Las sinucleínas fosforiladas fueron incubadas con proteasoma por los tiempos indicados en los gráficos y los productos de reacción analizados por SDS-PAGE al 16% y autorradiografía. Los gráficos presentados son el resultado de la cuantificación de la radiactividad presente en sinucleína intacta a lo largo del tiempo de incubación (\pm SD, $n=3$ tomando como uno el valor obtenido a tiempo 0).

Los resultados obtenidos con *c-abl* (Fig. 26 B) muestran que la sinucleína silvestre y el mutante A53T fosforilados por *c-abl* se degradan de forma similar, mientras que la degradación del mutante A30P por *c-abl* está claramente disminuida respecto a los anteriores.

2. ESTUDIOS DE AUTOANTICUERPOS EN SUERO Y EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (CNS) caracterizada por inflamación perivascular y desmielinización en la sustancia blanca (Steinman y col., 1996; Noseworthy y col., 1999; Noseworthy y col., 2000). La presencia de depósitos de inmunoglobulinas, macrófagos y células B y T en lesiones conduce a la idea de que la desmielinización es debida a una respuesta inmune, desencadenada por factores ambientales en individuos genéticamente predispuestos y perpetuado por un mecanismo autoinmune (Steinman y col., 1996; Noseworthy y col., 1999; Noseworthy y col., 2000). Los antígenos que conducen a la respuesta autoinmune en MS no están todavía claros. En este contexto, las proteínas constituyentes de la mielina han sido estudiadas como posibles dianas de la reactividad autoinmune en la patogénesis de MS. La importancia de los antígenos derivados de la mielina cuyos principales constituyentes: proteína básica de mielina (MBP) y proteína proteolipídica (PLP); y constituyentes minoritarios como la glicoproteína asociada a mielina (MAG) y glicoproteína de mielina oligodendrocítica (MOG), ha sido demostrada por su capacidad para producir encefalomielitis alérgica experimental (EAE), una enfermedad similar a MS en modelos animales (Wong y col., 1994; Steinman y col., 1999). En MS, la respuesta de estos antígenos de la mielina ha sido descrita y está implicada en la progresión de la enfermedad, pero la respuesta de las células T a MBP, PLP y MOG ha sido encontrada con similar frecuencia en individuos sanos y en pacientes con MS (Wucherpfennig y col., 1997; Warren y col., 1995; Diaz-Villoslada y col., 1999).

La respuesta humoral en pacientes con MS, aparte de este papel en mediar la desmielinización (Steinman y col., 1996; Noseworthy y col., 1999; Noseworthy y col., 2000; Lassmann y col., 2001), proporciona una razón para el estudio de la respuesta de células T en pacientes con MS. La presencia de autoanticuerpos circulantes contra MBP en pacientes de MS es más bien controvertida (Colombo y col., 1997), pero pueden ser obtenidos desde lesiones desmielinizantes (Wucherpfennig y col., 1997; Warren y col., 1995). La respuesta inmune mediada por células T y anticuerpos contra transaldolasa de oligodendrocitos (Colombo y col., 1997; Banki y col., 1994; Esposito y col., 1999) y contra α B-cristalino (van Noort y col., 1995; Agius y col., 1999) han sido descritas en pacientes con MS. 2'-3' nucleótidos cíclicos 3' fosfodiesterasa, una proteína presente en las membranas de mielina, ha sido también descrita como diana de la respuesta humoral en

pacientes con MS. No obstante, la utilidad clínica de esos autoanticuerpos sigue sin ser totalmente establecida.

La primera evidencia de que le proteasoma está implicado en enfermedades autoinmunes la encontramos en sueros de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) que presentaba autoanticuerpos específicos contra diferentes polipéptidos del proteasoma (Arribas y col., 1991), después confirmado por otros autores (Feist y col., 1996). Trabajos posteriores de nuestro grupo demostraron que autoanticuerpos anti-proteasoma no se presentaban en varias enfermedades autoinmunes incluyendo: artritis reumatoide, vasculitis, dermatomiositis, polimiositis, escleroderma, enfermedades autoinmunes del tiroides, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y hepatitis autoinmune (Mayo y col., 2000).

2.1 Detección de anticuerpos anti-proteasoma en suero y en LCR de pacientes de EM

Sueros procedentes de 102 pacientes con esclerosis múltiple (EM) y de 100 de individuos sanos fueron analizados por inmunodetección frente a proteasoma purificado (1-2 μ g). Se consideraron con reactividad positiva frente al proteasoma cuando se observó inmunorreacción frente a uno o varios polipéptidos del proteasoma a diluciones séricas 1/100 o mayores. Los sueros de 65 pacientes con esclerosis múltiple dieron positivo en este rastreo (resultados representativos se muestran en la Fig. 27).

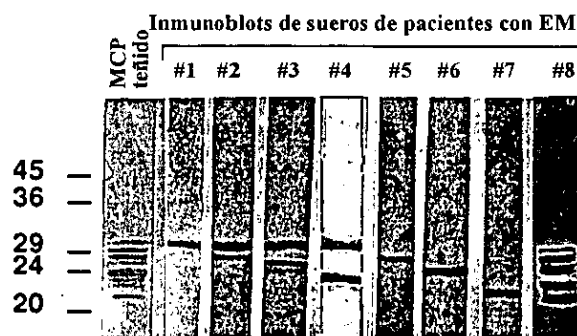


Figura 27. Resultados representativos de la inmunorreactividad de sueros de pacientes con EM frente al proteasoma. Proteasoma purificado de hígado de rata se cargó en geles continuos de poliacrilamida al 14% SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se cortaron en tiras. Las tiras se tiñieron con rojo Ponceau (MCP teñido) o fueron incubadas con distintos sueros de pacientes de esclerosis múltiple, indicados en la parte superior de cada carril. El procedimiento detallado se describe en Materiales y Métodos

Resultados similares se obtuvieron con proteasoma purificado de eritrocitos humanos (datos no mostrados). No se detectó seropositividad en el suero de individuos

sanos (n=100), ni en sueros de pacientes con otras enfermedades neurológicas (n=40, el diagnóstico de estos pacientes se detalla en Materiales y Métodos 3.1). Para demostrar la especificidad anti-proteasoma de los sueros de los pacientes con EM, los anticuerpos presentes en el suero fueron purificados por afinidad contra proteasoma purificado y analizados por inmunodetección con extractos de tejido total y proteasoma purificado. Los anticuerpos purificados por afinidad detectaron polipéptidos con masa similar en muestras de proteasoma purificado y en extractos totales de cerebro o hígado (datos no mostrados; ver Fig. 32A para la especificidad de anticuerpos anti-HC8). Estos resultados indican que la inmunorreactividad frente a proteasoma en sueros de pacientes de EM es específica y no debido a reactividad cruzada con otros antígenos.

La mayoría de los pacientes con esclerosis múltiple se presentan con la forma clínica de EM recurrente-remitente (EM-RR), pero más del 50% de estos pacientes eventualmente desarrollan una EM progresiva secundaria (EM-PS). Una minoría, aproximadamente el 10% de los pacientes, presentan EM progresiva primaria (EM-PP). La seropositividad contra el proteasoma fué encontrada en 34 de 59 (58%) de los pacientes con EM-RR, en 25 de 31 con EM-PS (81%) y en 6 de 12 (59%) de pacientes con EM-PP. Como consecuencia, la presencia de anticuerpos anti-proteasoma no se limita a un grupo particular de pacientes con EM. Para determinar las fluctuaciones en la inmunorreactividad de proteasoma en el curso de la enfermedad, sueros de 14 pacientes de EM positivos y de 10 negativos fueron analizados en 2 a 6 ocasiones diferentes, con intervalos comprendidos entre 6 meses y 5 años. El análisis por inmunodetección de estos sueros tomados secuencialmente mostró que la inmunorreactividad frente a proteasoma permanece constante a lo largo de la evolución de la enfermedad (datos no mostrados).

Muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) fueron también analizadas para la detección de anticuerpos anti-proteasoma. LCR de pacientes con EM seronegativos para el proteasoma (n=6) y de controles sanos (n=10) fueron negativos a dilución 1/5. Sin embargo, 8 de 12 muestras de LCR de pacientes seropositivos contra el proteasoma fueron positivas a una dilución 1/20 (título 1/40-1/200). Además 8 de 8 sueros de distintos pacientes con EM y sus correspondientes LCRs obtenidos del "National Neurological Research Bank (USA)" fueron también positivos). La Fig. 28 muestra los resultados obtenidos con uno de estos pacientes (10550). Tanto el suero como el LCR de este paciente contenían anticuerpos contra casi todas las subunidades del proteasoma (similar

al paciente 8 mostrado en la Fig. 27). La Fig. 28 ilustra también una característica común de la autorreactividad contra el proteasoma, los anticuerpos dirigidos contra las distintas subunidades del proteasoma se encuentran tanto en el suero como en LCR a títulos muy distintos. Por otro lado, el título de los anticuerpos contra el proteasoma fue entre 5-10 veces menor en LCR que en el suero del mismo paciente. No obstante, la concentración de anticuerpos contra proteasoma respecto al contenido total de Igs está incrementada al menos 50 veces en LCR respecto al suero.

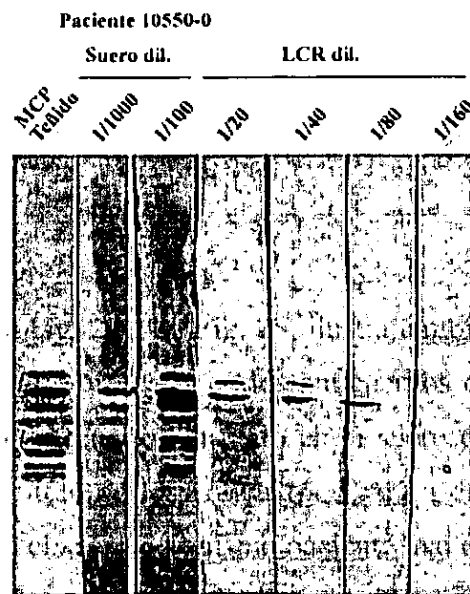


Figura 28. Inmunorreactividad de suero y LCR del paciente 10550-0 a diferentes diluciones frente a proteasoma. Proteasoma purificado de hígado de rata se cargó en geles continuos de poliacrilamida al 14%. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se cortaron en tiras. Las tiras se tiñeron con rojo Ponceau (MCP teñido) o se incubaron con diferentes diluciones de suero o líquido cefalorraquídeo del paciente 10550-0 con esclerosis múltiple. Las diluciones utilizadas se indican en la parte superior de cada carril. El procedimiento detallado se describe en Materiales y Métodos.

2.2 Los autoanticuerpos anti-proteasoma son predominantemente IgM e IgG en suero y en LCR

Para determinar la clase de Ig responsable de la respuesta anti-proteasoma, se analizaron suero y LCR de pacientes de EM con anticuerpos secundarios específicos para IgA, G o M humanos. Resultados representativos se muestran en la Fig. 29. La respuesta predominante anti-proteasoma es de tipo IgM y/o IgG, tanto en el suero como en LCR en todos los pacientes estudiados (n=15). Para un paciente determinado, algunos polipéptidos del proteasoma son principalmente reconocidos por inmunorreactividad de tipo IgM

mientras otros por inmunorreactividad de tipo IgG. Solamente el suero de un paciente de 30 sueros de distintos pacientes analizados presentó una reactividad predominante de tipo IgA (datos no mostrados). Los siguientes hechos: a) la presencia en suero y en LCR de pacientes con EM de anticuerpos de tipo IgM e IgG contra varias subunidades del proteasoma con diferentes títulos, b) la concordancia de la clase de Ig de los anticuerpos anti-proteasoma presentes en LCR y suero y c) la estructura oligomérica del proteasoma; claramente sugieren que la respuesta autoinmune en pacientes con EM es oligo o policlonal y que durante el curso de la EM se debe de producir una ampliación en el espectro de epítomos que eventualmente puede conducir a la presencia de autoanticuerpos contra todas las subunidades del proteasoma.

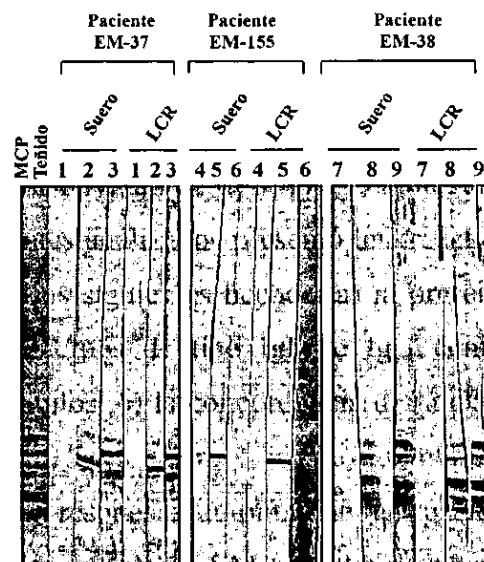


Figura 29. Estudio de las clases de inmunoglobulinas anti-proteasoma presentes en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo de pacientes con EM. Sueros (dilución 1/400) y LCR (dilución 1/40) de los pacientes con EM indicados se ensayaron contra proteasoma purificado (MCP teñido). El revelado se realizó con anticuerpos contra las distintas clases de inmunoglobulinas humanas conjugados con fosfatasa alcalina, anti-Ig A (carriles 1, 4 y 7), anti-Ig G (carriles 2, 5 y 8) y anti-Ig M (carriles 3, 6 y 9) respectivamente.

2.3 Detección de autoanticuerpos contra el proteasoma con subunidades recombinantes

El proteasoma de eucariotas está compuesto de 7 subunidades distintas α y 7 β . La identificación de las subunidades reactivas por SDS-PAGE es difícil y el análisis en geles bidimensionales lleva demasiado tiempo y puede requerir microsecuenciación. La caracterización de inmunoreactividad utilizando proteínas recombinantes es una aproximación usual en el estudio de enfermedades autoinmunes. Con este fin, las

subunidades recombinantes C2, C8, C9 y C5 del proteasoma fueron usadas como sustrato en un análisis por inmunodetección con sueros de pacientes de EM. Resultados representativos se muestran en la Figura 30.

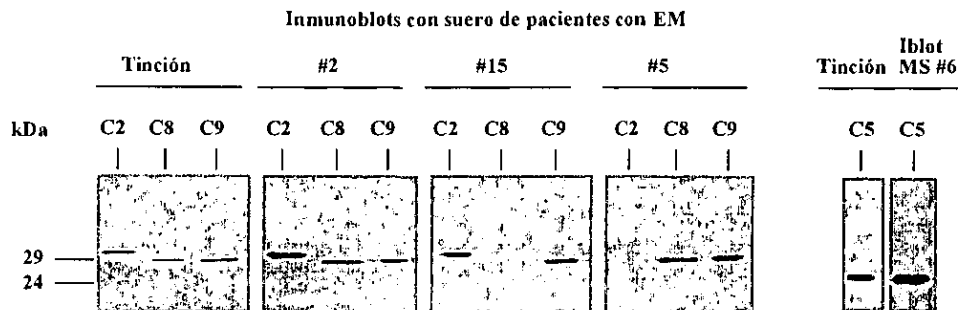


Figura 30. Subunidades recombinantes de proteasoma pueden ser utilizadas para detección de la serorreactividad de pacientes con EM. Las subunidades recombinantes purificadas alfa (C2, C8 y C9) y beta (C5) del proteasoma fueron separadas por SDS-PAGE al 14% y teñidas con Coomassie (como se indica) o transferidas a membranas y posteriormente incubadas con sueros de diferentes pacientes de EM (indicados en la parte superior de cada Iblot). Los Iblots #2, #5 y #6 se corresponden con los sueros de pacientes de los Iblots #2, #5 y #6 respectivamente, mostrados en la Fig 1. El Iblot #15 corresponde al suero de un paciente que analizado frente a proteasoma presentaba un patrón idéntico al mostrado por el paciente # 2.

El suero del paciente 2 (Fig. 27) y el paciente 15 (no mostrado) reconocen polipéptidos de 32 y 28 kDa del complejo total del proteasoma purificado. La Fig. 30 muestra que el suero del paciente 2 tiene anticuerpos contra el C2 (32 kDa) y contra las subunidades C8 y C9 del proteasoma (que comigran a 28 kDa en SDS-PAGE de una dimensión, Fig. 27); sin embargo el suero del paciente 15 contiene anticuerpos contra las subunidades del proteasoma C2 y C9, pero no contra la subunidad C8. El suero del paciente 5 reacciona contra un polipéptido del proteasoma de 28 kDa (Fig. 27) y contiene anticuerpos contra las subunidades recombinantes C8 y C9 (Fig. 30). El suero del paciente 6 reconociendo un polipéptido del proteasoma de 23 kDa (Fig. 27), contiene anticuerpos contra la subunidad beta C5 (Fig. 30). Estos resultados muestran que las subunidades del proteasoma producidas en bacteria pueden ser utilizadas para detectar y caracterizar el repertorio de autoanticuerpos presentes en pacientes con EM; y que los principales epítomos reconocidos por estos autoanticuerpos están presentes en la secuencia primaria de las subunidades.

2.4 Localización de los epítomos de anticuerpos anti-C2 de suero de pacientes con EM

Otra ventaja de los antígenos recombinantes es que permiten la localización de los epítomos reconocidos por los autoanticuerpos. Utilizando la subunidad C2 recombinante se encontró seropositividad por inmunodetección en 14 de 32 pacientes de EM seropositivos contra proteasoma (dilucción 1/100). Para definir las regiones de la subunidad C2 del proteasoma contra las que van dirigidos los autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes, se obtuvieron diferentes construcciones por deleciones parciales del cDNA completo de la subunidad C2. Los resultados obtenidos con los sueros de 4 pacientes de EM representativos de seropositividad anti-C2 son mostrados en la Fig. 31.

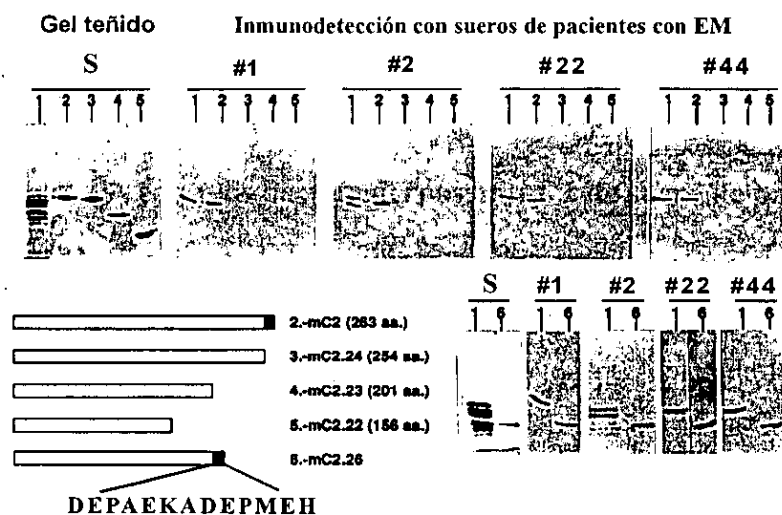


Figura 31. Mapeo de epítomos para los autoanticuerpos anti-C2 presentes en sueros de pacientes de EM. El panel S muestra un análisis por SDS-PAGE al 16% teñido con Comassie del proteasoma purificado (carril 1) y de las proteínas recombinantes (carriles 2 a 6) usadas para mapear los epítomos. El resto de paneles son inmunoblots con sueros de difwrwbrwa pacientes con EM indicados en la parte superior de cada uno. El esquema de las diferentes construcciones de la proteína C2 usadas para el mapeo de los epítomos se muestra en la parte inferior de la figura junto con la secuencia de aminoácidos del principal epítomo de C2 reconocido por sueros de pacientes de EM.

Estos sueros reconocen la subunidad C2 presente en el complejo del proteasoma purificado y la subunidad C2 completa recombinante (Fig. 31, carriles 1 y 2, respectivamente). La deleción del COOH-terminal de la subunidad C2 (construcción mC2.24) que elimina los 13 últimos aminoácidos no es reconocida por los anticuerpos presentes en los sueros de estos pacientes (Fig. 31, carriles 3). Deleciones mayores desde el COOH terminal (construcciones mC2.23 y 22, Fig. 31 carril 4 y 5) no son reconocidas por los

sueros de pacientes de EM. La adición a una forma truncada de la subunidad C2 (mC2.23) del DNA codificante para el COOH de la subunidad C2 genera la construcción mC2.26, esta proteína es claramente reconocida por los sueros de estos pacientes (Fig. 31, carriles 6). Además, una proteína de fusión de glutatión transferasa y los 13 últimos aminoácidos del COOH-terminal del C2 es también reconocida por los sueros de estos pacientes (datos no mostrados).

Resultados similares a los mostrados se obtuvieron con sueros procedentes de 10 pacientes distintos, todos ellos seropositivos contra la subunidad C2. Estos resultados demuestran claramente que los últimos 13 aminoácidos del COOH-terminal de la subunidad C2 (DEPAEKADPEMEH) constituyen el principal epítipo contra el que van dirigidos los autoanticuerpos anti-C2 presentes en pacientes con EM.

2.5 Localización de los epítipos de anticuerpos anti-C8 de suero de pacientes de EM

Teniendo en cuenta que las principales diferencias de secuencia entre las distintas subunidades α del proteasoma residen en la zona COOH-terminal y que el epítipo predominante de la subunidad C2 se localiza en la región COOH terminal de esta subunidad, decidimos estudiar la localización de los epítipos en otra subunidad α para ver si también se localizaban en dicha región COOH-terminal. Utilizando la subunidad α C8 recombinante se encontró seropositividad por inmunoblot en 7 de 40 pacientes de EM seropositivos contra proteasoma (dilución 1/100). Para demostrar la presencia de anticuerpos específicos contra la subunidad C8 en el suero de pacientes con EM, anticuerpos anti-C8 fueron purificados por afinidad contra la subunidad recombinante purificada y analizados por inmunodetección contra una fracción de un paso de purificación del proteasoma (DEAE) y contra la subunidad recombinante C8 purificada. Los resultados obtenidos (Fig.32 A) demuestran que la inmunorreactividad anti-C8 de este suero es debida a la presencia de anticuerpos específicos contra C8 y no a la reacción cruzada de otros anticuerpos presentes en el suero con esta subunidad del proteasoma (resultados similares se han obtenido con otros 4 sueros distintos).

La determinación de los epítipos contra los que van dirigidos los autoanticuerpos anti-C8 se llevó a cabo por inmunodetección frente a diferentes construcciones obtenidas por delección parcial del cDNA completo de la subunidad C8 (Fig. 32B). La delección

desde el extremo COOH hasta el aminoácido 180 (construcciones HC8.1 y HC8.2) no afecta al reconocimiento por los anticuerpos presentes en sueros de pacientes de EM, mientras que la delección hasta el aminoácido 96 (HC8.3) lleva a la pérdida del reconocimiento por estos sueros (Fig. 32C).

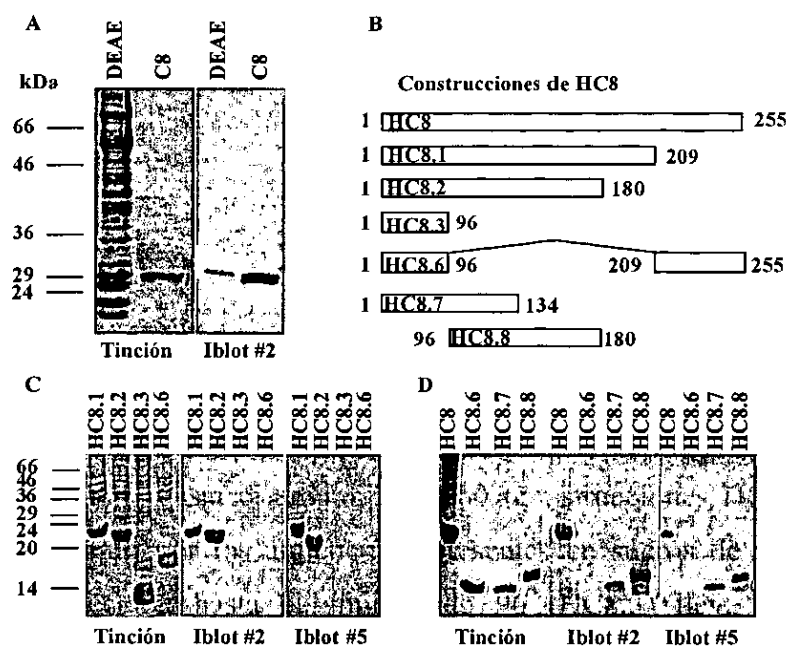


Figura 32. Mapeo de epítomos para los autoanticuerpos anti-C8 presentes en sueros de pacientes de EM. A, Las proteínas presentes en una fracción de DEAE de la purificación de proteasoma de cerebro y HC8 recombinante fueron analizadas por SDS-PAGE al 12% y el gel fue teñido con Coomassie o procesado para inmunoblot con anticuerpos purificados por afinidad contra HC8 obtenidos a partir del suero total del paciente #2. B, El esquema de las diferentes construcciones de la proteína C8 usadas para el mapeo de los epítomos. C y D, muestran el análisis por SDS-PAGE al 18% de las proteínas recombinantes utilizadas teñidas con Coomassie (gel teñido) y los correspondientes inmunoblots llevados a cabo con los sueros de los pacientes con EM que se indican en la parte inferior

La fusión del amino terminal de la subunidad C8 (aminoácidos 1-95) con el extremo COOH terminal (aminoácidos 209 a 255) con idéntica pauta de lectura que en el cDNA de la subunidad C8 (construcción HC8.6), tampoco es reconocida por los sueros de pacientes de EM. Estos resultados indican que el reconocimiento por los autoanticuerpos de la subunidad C8 parece residir en la región amino-terminal de la subunidad. Para delimitar dentro de esta región la localización de los epítomos reconocidos por los autoanticuerpos anti-C8 se realizaron dos nuevas construcciones: la construcción HC8.7 en la que se realizó una delección del COOH terminal hasta el aminoácido 134 y la construcción HC8.8 que expresa una proteína correspondiente a la secuencia del C8 entre los

aminoácidos 96 y 180. Ambas construcciones (HC8.7 y HC8.8) son claramente reconocidas por los sueros de los pacientes con EM (Fig. 32D). Con estos resultados podemos concluir que el/los epítipo/s de HC8 reconocidos por los sueros de pacientes con EM se encuentra/n en la región comprendida entre los aminoácidos 96 y 180 de la secuencia del HC8. Estos resultados muestran, además, que no todos los anticuerpos anti-subunidades α del proteasoma presentes en sueros de pacientes con EM van dirigidos contra el COOH terminal de las subunidades α .

2.6 Proliferación de PBMCs con antígenos proteasómicos recombinantes

Para investigar si el proteasoma puede ser una diana para células T autoreactivas, se evaluó el posible efecto del proteasoma sobre la proliferación de PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) obtenidas de pacientes con EM y controles. Para este estudio se seleccionó como antígenos: la proteína de fusión GST-C2Ct recombinante (que contiene el principal epítipo reconocido por autoanticuerpos contra C2) altamente purificada y la subunidad recombinante C8 purificada. Consideramos respuesta positiva de proliferación cuando el índice de proliferación es igual o mayor a 2 (Materiales y Métodos 3.3). Como se resume en la Tabla 1, 12 de 30 (40 %) pacientes con EM muestran un índice de estimulación igual o mayor a 2 usando la proteína de fusión GST-C2Ct y/o la subunidad recombinante C8. Destaca el hecho de que 8 de 8 pacientes de EM seronegativos frente a proteasoma son también negativos en los ensayos de proliferación, y que 12 de 22 (54 %) seropositivos anti-proteasoma son positivos en los ensayos de proliferación. Esta respuesta proliferativa es específica porque no se observó ninguna proliferación significativa de PBMCs de estos pacientes con las proteínas control, GST y EClpP, purificadas a partir de la misma bacteria huésped (ver Materiales y Métodos 2.1). La proliferación de PBMCs en individuos sanos (n=5) no fué estimulada significativamente por ninguna de las proteínas recombinantes (datos no mostrados). Estos resultados indican claramente que el proteasoma es también un autoantígeno para la respuesta celular en pacientes con EM.

Tabla 3. Datos de la enfermedad de pacientes de MS analizados en su respuesta proliferativa entre antígenos proteasómicos

Nº de paciente	Sexo	Edad inicial de síntomas	Duración de la enfermedad en años	Tipo de enfermedad	Anticuerpos ^A anti-proteasoma	Anticuerpos ^A anti-C2	Anticuerpos ^A anti-C8	IE de GSTC2-C-terminal ^B recombinante	IE de C8 ^B recombinante
8	M	16	7	RR	+++	++	++	1.5	2.2 ± 0.1*
37	V	45	24	PP	+++	+	+++	2 + 0.3*	3.8 ± 0.5*
38	V	18	7	RR	++	++	++	3.4 + 0.4*	2.2 ± 0.2*
39	M	42	5	RR	+++	+	++	2 + 0.2	3.5 ± 0.3*
40	V	45	2	RR	+++	+	+	3.1 + 0.4*	3.9 ± 0.4*
41	M	39	8	PP	+	++	+	3.1 + 0.2*	2.1 ± 0.3*
42	M	34	8	RR	++	+/-	negativo	2.9 + 0.3*	1.9
43	M	26	4	RR	++	++	negativo	2.4 + 0.3*	0.8
44	M	27	15	PS	++	negativo	+	1.4	3 ± 0.3*
45	M	29	12	PS	+	+	+	1.8	2.2 ± 0.3*
46	M	47	9	PS	+	negativo	++	1.1	2.7 ± 0.2*
47	M	26	10	PS	+	negativo	+	1.2	3.8 ± 0.4*
48	V	45	11	PP	+++	negativo	negativo	1.9	1.8
49	M	28	10	RR	++	negativo	negativo	1.6	1.1
50	V	44	22	PS	++	negativo	negativo	1.2	1.8
51	M	22	10	PS	++	negativo	negativo	1.1	1.8
52	M	35	12	PS	+	negativo	negativo	1.1	1.6
53	M	24	9	RR-PS	+++	negativo	+/-	1.6	01.9
54	V	34	4	RR	+++	negativo	++	0.9	1.2
55	M	25	15	RR-PS	+	+	negativo	0.8	1.1
56	M	22	7	RR-PS	++	++	negativo	0.6	1.6
57	M	32	7	RR	++	+++	negativo	0.9	0.9
58	V	20	4	RR	negativo	negativo	negativo	0.9	0.9
59	M	26	2	RR	negativo	negativo	negativo	0.8	0.7
60	M	32	10	PS	negativo	negativo	negativo	0.6	0.7
61	M	31	14	PS	negativo	negativo	negativo	0.6	0.8
62	V	23	10	RR-PS	negativo	negativo	negativo	0.9	1.1
63	M	25	20	PS	negativo	negativo	negativo	0.9	n.d.
64	M	20	30	PS	negativo	negativo	negativo	0.9	n.d.
65	M	43	18	PS	negativo	negativo	negativo	0.9	n.d.

^A Título de anticuerpos en suero:^B índice de estimulación SI.

n.d. No determinado

+++ > 1/1000 ; ++ 1/400 - 1/1000 ; + 1/200 - 1/400 ; +/- 1/100 - 1/200

* índice de proliferación positiva (=>2) SD (n=3), ensayado a 20 µg/ml de la proteína recombinante indicada respecto a la proteína control (GST, EClpF), ver Materiales y Métodos 3.3

DISCUSIÓN

Capítulo I

1. PAPEL DE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS EN SINUCLEOPATÍAS

1.1 Degradación de α -sinucleína por proteasoma 20S

La α -sinucleína es una proteína pequeña (14 kDa) que como ya hemos indicado carece de estructura secundaria y es muy abundante en neuronas. Los resultados presentados en esta tesis muestran que puede ser degradada directamente por el proteasoma 20S con una K_m (0.6 μ M) que se encuentra dentro del rango fisiológico de concentración de α -sinucleína en la célula, rango micromolar (Perrin y col., 2000). Este primer resultado puede parecer sorprendente en base al paradigma que postula la necesidad de ubiquitilación de una proteína para ser degradada por el proteasoma. Sin embargo, hay otras proteínas sin estructura secundaria que son también degradadas directamente por proteasoma 20S como proteína básica de mielina (Arribas y col., 1994; Lucas y col., 1992), caseína (Pereira y col., 1992) y p21^{waf} (Touitou y col., 2001); e incluso proteínas con estructura secundaria como Ikappab (Kroll y col., 1997). Por otro lado hemos mostrado que α -sinucleína contiene todos los elementos necesarios para dirigir una proteína que no es sustrato del proteasoma a degradación, la proteína de fusión GST- α -sinucleína es degradada y GST no es degradada por el proteasoma. De acuerdo con estos resultados α -sinucleína puede considerarse un degrón (Varshavsky, 1995), esto es, contiene las secuencias necesarias y suficientes para señalizarse a sí misma y a otras proteínas a degradación. Hemos intentado mapear más precisamente la región dentro de la secuencia de α -sinucleína responsable de la interacción con el proteasoma y de su degradación, los resultados obtenidos mediante deleciones muestran que la región ácida del COOH terminal de α -sinucleína no es requerida para la degradación; y la región N-terminal, donde se encuentran las repeticiones anfipáticas, parece ser requerida para una mayor eficiencia en la degradación. Dado el pequeño tamaño de α -sinucleína se requeriría un estudio por microdeleciones y/o mutaciones puntuales para mapear más precisamente la(s) región(s) de α -sinucleína requeridas para la interacción con el proteasoma. El siguiente paso ha sido estudiar como se producía el reconocimiento de α -sinucleína por el proteasoma 20S. En este sentido hemos demostrado que α -sinucleína interacciona con la

subunidad C8 ($\alpha 7$) del proteasoma y que esa interacción se produce con la región COOH terminal de la subunidad C8, ya que una proteína de fusión de esta región de la subunidad C8 con GST unió α -sinucleína e inhibe la degradación de α -sinucleína por proteasoma. Por tanto, la interacción de α -sinucleína se produce con los anillos externos del proteasoma a través de la subunidad $\alpha 7$. Dado que las subunidades α del proteasoma son inactivas, tiene que producirse una translocación de α -sinucleína al interior de la cámara catalítica formada por los dos anillos β . Este proceso de translocación no está claro como se produce. La mayor parte de los autores postulan que las proteínas que van a ser degradadas entran a través del hueco central de los anillos α externos, cuyo diámetro debería de aumentar para permitir la entrada de un polipéptido desplegado (Groll y col., 1997; Groll y col., 2000). La otra posibilidad de acceso a la cámara catalítica ha sido postulada también en base a la estructura del cristal y sería por interdigitación del polipéptido entre un anillo α y un anillo β con posterior translocación al interior de los anillos β (Groll y col., 1997). Es interesante hacer notar que otra proteína p21^{waf} degradada por proteasoma 20S interactúa también con la subunidad C8 del proteasoma para su degradación (Touitou y col., 2001) aunque los autores no han sido capaces de mostrar con que región de la subunidad C8 se produce esta interacción.

El abordaje del estudio de la degradación *in vivo* de sinucleína se llevó a cabo con un doble objetivo: estudio de degradación y de localización subcelular. Dado que los niveles de expresión de α -sinucleína son bajos en las líneas celulares en cultivo que disponíamos, estos experimentos requerían la previa transfección para la sobre expresión de α -sinucleína. Para llevar a cabo los dos objetivos se obtuvieron líneas celulares que expresan establemente una construcción de fusión de EYFP con sinucleína. El estudio se ha realizado en dos tipos de líneas transfectadas establemente, CHO de origen no neural y PC12, derivadas de un feocromocitoma de rata. Lo primero que se comprobó es que la proteína de fusión era degradada por proteasoma 20S *in vitro*, resultado esperable en base a los resultados que habíamos obtenido con la proteína de fusión GST- α -sinucleína. La vida media de la proteína de fusión EYFP- α -sinucleína tanto en PC12 como en CHO es muy larga. Estos resultados concuerdan con lo descrito en PC12 y HEK293 transfectadas con una construcción de α -sinucleína marcada con un epítipo FLAG (Okochi y col., 2000a), y es mucho mayor que la determinada para α -sinucleína marcada con un epítipo de His

(Bennett y col., 1999) en SH-SY5Y (1.84 h). La diferencia en la vida media de EYFP- α -sinucleína en CHO (37 h) y el PC12 (19 h) parecería indicar que el recambio de α -sinucleína en una línea de origen neural sería mas rápido que en células de origen no neural, este resultado parece también observarse (aunque los autores no calculan los valores de vida media) en el estudio con FLAG- α -sinucleína en PC12 y HEK293 antes mencionado (Okochi y col., 2000a). Sería por tanto posible que algún mecanismo celular presente en las células de origen neural facilite la degradación de α -sinucleína, y aunque poco probable, podría explicar que la vida media en SH-SY5Y fuera todavía mucho menor que la observada por nosotros en PC12. Una crítica general, tanto a los experimentos presentados aquí como a los reportados por otros autores, es que el estudio de la degradación se realiza con α -sinucleína que lleva aminoácidos extra, lo que podría modificar la vida media de la proteína resultante en comparación con α -sinucleína silvestre. En nuestro caso se sabe que la vida media de la EYFP es mayor de 24 h (Corish y Tyler-Smith, 1999), por lo tanto, la fusión con α -sinucleína desestabiliza a la proteína resultante en el caso de PC12 ($t_{1/2}$ de 19 h) y no parece afectar en el caso de CHO ($t_{1/2}$ de 37 h). La inhibición de la degradación de EYFP- α -sinucleína por la presencia de inhibidores del proteasoma (mostrado con MG132, pero similares resultados se obtienen con lactacistina) sugiere que el proteasoma es responsable de esa degradación. Este resultado concuerda con la inhibición de la degradación de His-sinucleína en SH-SY5Y por clasto-lactacistina- β -lactona (Bennett y col., 1999). En conjunto estos resultados permiten concluir que α -sinucleína es degradada por proteasoma *in vivo*.

Si una proteína es degradada por proteasoma *in vivo* cabe esperar que el tratamiento de las células con inhibidores del proteasoma produciría un aumento en la cantidad de proteína, esto es, se debería producir un aumento de la cantidad de proteína en estado estacionario. El tratamiento de las células CHO y PC12 establemente transfectadas con EYFP- α -sinucleína produce un cambio poco significativo en los niveles de la proteína respecto al control. Este resultado parecería ir en contra de lo concluido anteriormente, de hecho otros autores en base a experimentos similares con inhibidores del proteasoma en HEK293 y en TSM1 (Ancolio y col., 2000) concluyen que la α -sinucleína no es degradada por proteasoma. Para interpretar estos experimentos correctamente hay que tener en cuenta la vida media de la proteína cuyos niveles en estado estacionario se están estudiando. En el presente caso dado que la vida media es de 19 y 37 h, tratamientos con inhibidores de

proteasoma por tiempos inferiores a la vida media de la proteína no es previsible que produzcan un incremento sustancial en la cantidad de proteína detectada (los incrementos serían menores a 1.5 veces). Estas son las condiciones de tratamiento en el trabajo de Ancolio y col. (Ancolio y col., 2000) que tratan las células durante 15 h y la vida media de α -sinucleína en HEK293 determinada por otros autores (Okochi y col., 2000a) es superior a 48 h. Siguiendo el mismo criterio en nuestro caso con tratamientos de hasta 24 h cabría esperar un aumento como máximo de 1.6 veces en PC12 ($t_{1/2}$ 19 h) y 1.3 veces en CHO ($t_{1/2}$ 39 h), estos cambios son difícilmente detectables por la variabilidad experimental de la técnica de inmunoblot utilizada para la cuantificación de la cantidad de proteína. Por tanto, los estudios de niveles estacionarios de proteína en presencia o en ausencia de inhibidores del proteasoma para proteínas con vida media larga no permiten llegar a ninguna conclusión cuando los tiempos de tratamiento son inferiores o ligeramente superiores a la vida media de la proteína. Obviamente este razonamiento lleva a plantearse que esos experimentos hay que realizarlos con tiempos de tratamiento al menos 2 veces la vida media de la proteína, en nuestro caso durante 38 h (PC12) y 78 h (CHO), respectivamente. En consecuencia se realizaron estos experimentos con las células transfectadas en presencia y ausencia de inhibidor de proteasoma por 48 h y el resultado fue que la presencia del inhibidor resultó tóxica para las células produciéndose una extensiva muerte celular, con lo que los resultados no son interpretables.

Otro punto importante respecto a la degradación de sinucleína por proteasoma *in vivo*, sería demostrar si requiere o no previa ubiquitilación. No hemos obtenido ninguna evidencia a favor de la ubiquitilación *in vivo* de α -sinucleína, ni en los experimentos directos de inmunodetección de extractos celulares, ni en los experimentos de marcaje metabólico (mas sensibles). Recientemente se ha publicado que una forma glicosilada de α -sinucleína (presente en el cerebro de pacientes con PD) puede ser ubiquitilada *in vitro* por acción de Parkin (Shimura y col., 2001); sin embargo, también recientemente por experimentos de transfección se ha mostrado que α -sinucleína sin modificar no es ubiquitilada *in vivo* (Chung y col., 2001) incluso aunque se cotransfecte con Parkin. Los resultados aquí presentados junto con estos resultados recientemente publicados permiten concluir que α -sinucleína silvestre no es ubiquilada *in vivo*.

Las proteínas de fusión EYFP- α -sinucleína tanto en CHO como en PC12 nos han servido para el estudio de su localización subcelular, localizándose tanto en el núcleo como en el citoplasma celular. Esta localización no es concordante con lo que se observa en neuronas donde parece claro que α -sinucleína solamente se localiza en membrana y citoplasma. El resultado obtenido puede ser debido a la sobreexpresión, puesto que resultados similares se han obtenido cuando se transfectan cultivos primarios de neuronas con α -sinucleína (McLean y col., 2000). Las células transfectadas permanentemente han permitido también estudiar el comportamiento de EYFP- α -sinucleína tras el tratamiento con inhibidores del proteasoma. Los resultados presentados muestran la formación de agregados intracitoplásmicos de EYFP- α -sinucleína. Resultados similares han sido descritos (McLean y col., 2001) utilizando una proteína de fusión α -sinucleína-EGFP (α -sinucleína fusionada al N-terminal de la EGFP). Sin embargo, hay una importante diferencia en cuanto al origen de los agregados aquí presentados y los reportados por MacLean y col. (McLean y col., 2001). La construcción de fusión α -sinucleína-EGFP sufre un corte proteolítico limitado cuando las células son tratadas con inhibidores del proteasoma en la secuencia de la EGFP, y ese producto de degradación parcial es el que se acumula en los agregados (McLean y col., 2001). En las células transfectadas con EYFP- α -sinucleína, el tratamiento con MG132 no produce ningún corte limitado de la proteína de fusión, ni por detección con anticuerpos anti- α -sinucleína ni por detección con anticuerpos anti-EGFP (resultados no mostrados). Estos resultados indican que la proteína de fusión α -sinucleína-EGFP se comporta de forma diferente a la EYFP- α -sinucleína. La proteína α -sinucleína-EGFP en presencia de inhibidores de proteasoma sería procesada por otra proteasa y daría lugar al acumulo de un producto de 27 kDa que no es fluorescente como consecuencia del corte proteolítico dentro de la secuencia de la EGFP (McLean y col., 2001), mientras que EYFP- α -sinucleína cuando el proteasoma es inhibido permanece intacta y como tal se agrega. Además hemos mostrado que parte del proteasoma celular colocaliza con esos agregados de EYFP- α -sinucleína de forma similar a lo descrito en los cuerpos de Lewy (Fergusson y col., 1996). Por todo lo anteriormente expuesto el modelo experimental de agregación presentado se aproxima más a lo que debe de ocurrir en la formación de los cuerpos de Lewy que el modelo ya descrito.

La degradación *in vitro* por proteasoma de las formas variantes de α -sinucleína A53T y α -sinucleína A30P no presenta diferencias significativas con respecto a la α -sinucleína silvestre. Estos resultados *in vitro*, junto con lo publicado por otros autores en experimentos con las formas mutadas y tratamientos con inhibidores de proteasoma (Ancolio y col., 2000; McLean y col., 2001), sugieren que *in vivo* no debe haber diferencias significativas en la degradación de las α -sinucleínas mutantes respecto a la silvestre.

En conclusión, los experimentos presentados muestran que α -sinucleína es degradada directamente por el proteasoma 20S por interacción directa de α -sinucleína con la subunidad C8 (α 7) del proteasoma y no requiere previa ubiquitilación. La sobreexpresión de una proteína de fusión EYFP- α -sinucleína y la inhibición del proteasoma conducen a la agregación de esta proteína *in vivo*, por lo que puede ser considerada esta proteína de fusión como una buena herramienta para estudios destinados a comprender los mecanismos responsables de la agregación de α -sinucleína.

1.2 Modificaciones post-traduccionales de α -sinucleína.

En el trabajo presentado se ha mostrado que α -sinucleína es susceptible de fosforilación *in vitro* por dos Ser/Thr quinasas: CKI y CKII; y por dos tirosina quinasas; c-src y c-abl. Además se han identificado los residuos de α -sinucleína que son fosforilados *in vitro* por las cuatro proteína quinasas. Los resultados obtenidos con CKI y CKII concuerdan con resultados publicados mientras este trabajo estaba en marcha (Okochi y col., 2000a). CKI y CKII fosforilan α -sinucleína principalmente en S129. La estequiometría de fosforilación por CKII es de uno, mientras que la de CKI es próxima a dos lo que indicaba la presencia de otro sitio de fosforilación además de la S129. En el trabajo antes mencionado se identifica este segundo sitio de fosforilación por CKI y corresponde a la serina en posición 87 (Okochi y col., 2000a). La S129 también se ha demostrado que puede ser fosforilada por GRKs (quinasas de receptores acoplados a proteínas G) en concreto por GRK2 y GRK5 (Pronin y col., 2000).

La fosforilación de α -sinucleína por c-src *in vitro*, aunque efectiva, no alcanza una estequiometría de 1 aún en condiciones óptimas. Este hecho que podría hacer pensar que la fosforilación encontrada no sería significativa por ser subestequiométrica es, sin embargo,

la situación habitual en los estudios de fosforilación de proteínas por c-src. La fosforilación por c-src de sustratos bien caracterizados es también subestequiométrica, ej: 0.07 moles/mol para enolasa y 0.34 moles/mol para proteína fosfatasa 1 (Johansen y Ingebritsen, 1986; Feder y Bishop, 1990). El mapeo de los sitios de fosforilación de α -sinucleína por c-src muestra que Y125 e Y133 son los principales sitios aceptores de fosforilación para c-src. Estos datos concuerdan en parte con los reportados por Ellis y col (Ellis y col., 2001), que por estudios de transfección muestran que α -sinucleína se fosforila por miembros de la familia de c-src; pero su estudio con mutaciones puntuales Y/F muestra que la fosforilación tiene lugar casi exclusivamente en Y125 en las células transfectadas. Otros autores han mostrado también la fosforilación de α -sinucleína por c-fyn y en este caso de nuevo por estudio de mutantes puntuales concluyen que el principal sitio aceptor de fosforilación es la Y125 de α -sinucleína (Nakamura y col., 2001). Aunque es muy posible que en las condiciones celulares solamente la Y125 de α -sinucleína sea capaz de ser fosforilada de forma eficiente por miembros de la familia de c-src, los estudios de fosforilación *in vitro* indican que puede darse también fosforilación en Y133. No es difícil de imaginar que en las condiciones celulares la fosforilación de la Y125 de α -sinucleína pueda ser un pre-requisito para la posterior fosforilación de la Y133. En este sentido, Ellis y col (Ellis y col., 2001) muestran que la α -sinucleína mutante Y133F tiene mayor nivel de fosforilación en Tyr que la α -sinucleína silvestre. Solamente el estudio directo de incorporación de ^{32}P tras la activación de c-src o de c-fyn en la célula permitirán dilucidar estos sitios de fosforilación de α -sinucleína.

El estudio de la fosforilación de α -sinucleína por c-abl muestra por primera vez que esta proteína quinasa es capaz de fosforilar α -sinucleína. Como en el caso de c-src la fosforilación de α -sinucleína por c-abl es subestequiométrica. En el caso de c-abl los estudios de fosforilación de otras proteínas arrojan resultados muy variables. El dominio COOH-terminal de RNA pol II es capaz de ser fosforilado por c-abl con una estequiometría de 30 moles/mol (Baskaran y col., 1993) y uno de los sustratos más utilizados para ensayo de actividad de c-abl, la proteína adaptadora c-Crk se fosforila con una estequiometría próxima a uno (Rosen y col., 1995; Ren y col., 1994). La estequiometría de fosforilación de α -sinucleína por c-abl de 0.3-0.4 moles/mol concuerda bien con la fosforilación relativa de α -sinucleína respecto a GST-Crk en nuestras

condiciones de ensayo (60%). El mapeo de los sitios de fosforilación de α -sinucleína por c-abl nos permiten concluir que el principal sitio aceptor es la Y39 y secundariamente las Tyr 125 y 133. Es de hacer notar que la fosforilación por c-abl de α -sinucleína no pudo predecirse con los algoritmos al uso en PROSITE o en NetPhos, de hecho la Y39 se encuentra en un entorno de secuencia (TKEGVYVGSKT) que no se parece a los sitios consenso (YXXP, YMXM) de fosforilación descritos para c-abl (García y col., 1993; Songyang y col., 1993). También hemos mostrado que la construcción EYFP- α -sinucleína es fosforilada *in vivo* tras la sobreexpresión de c-abl o de una forma constitutivamente activa de c-abl (c-abl SH3), mientras que EYFP carece de sitios de fosforilación por c-abl (Yang y col., 1999) no es fosforilada (datos no mostrados). En conjunto los datos presentados permiten concluir que α -sinucleína puede ser fosforilada tanto *in vitro* como *in vivo* por c-abl, quedaría por demostrar si *in vivo* el sitio mayoritario de fosforilación es coincidente con el encontrado *in vitro*.

Tanto la forma silvestre de α -sinucleína como los dos mutantes A30P y A53T se fosforilan *in vitro* con la misma eficiencia y presentan similares estequiometrías de fosforilación por las cuatro quinasas estudiadas (CKI, CKII, c-src y c-abl). Estos datos sugieren que las mutaciones A30P y A53T no afectan al reconocimiento por estas cuatro proteína quinasas. Resultados similares han sido descritos para la fosforilación por c-fyn (Nakamura y col., 2001). Un punto crítico, tanto para el estudio aquí presentado como para los ya publicados respecto a la fosforilación de α -sinucleína por diferentes proteína quinasas, es que todos estos experimentos se han realizado por experimentos de sobreexpresión tanto de las quinasas como de la α -sinucleína, permanece como cuestión demostrar que esas fosforilaciones ocurran en condiciones fisiológicas.

1.3 Relevancia funcional de la fosforilación de α -sinucleína

Aunque la función de α -sinucleína no está clara, el hecho de que sea sustrato de varias proteína quinasas sugiere que participa en una ruta de señalización desde el medio extracelular. La fosforilación por CKI y CKII se ha mostrado que es constitutiva (Okochi y col., 2000b) y se sabe que CKI α se asocia con vesículas sinápticas (Gross y col., 1995) y que la actividad de CKI se incrementa en neuronas nigroestriatales durante el desarrollo de PD (Desdouits y col., 1995). Estos hechos hacen pensar que la fosforilación de α -de la

función de la proteína. La fosforilación de la S129 por GRK2 hace pensar que sobre la fosforilación constitutiva por CKI y CKII se superpondría una fosforilación regulada a través de la activación de receptores 7-transmembrana, aunque no hay por el momento evidencia de este extremo (Pronin y col., 2000).

La fosforilación por c-src y por c-fyn, dos miembros de la familia src de proteína tirosina quinasas periféricas, hace pensar que α -sinucleína se encuentra en relación con la transducción de señales en la región presináptica donde se sabe que se localizan preferencialmente estas tirosina quinasas (Sudhof, 1995). Mientras que la fosforilación de α -sinucleína por estas dos tirosinas quinasas ocurre fundamentalmente en el COOH terminal con lo que su función sería probablemente similar a la fosforilación por CKI, CKII y GRK2, la fosforilación de α -sinucleína por c-abl tiene lugar preferencialmente en la región N-terminal (Y39). La tirosina kinasa c-abl fue identificada como el homólogo celular de gag-v-abl presente en el virus de la leucemia murina de Abelson (Goff y col., 1980). La translocación desde su posición en el chr 9 al chr 22 da origen al producto de fusión bcr-abl característico del cromosoma Filadelfia presente en la leucemia mieloide crónica (Sawyers, 1999). C-abl se expresa de forma ubiqa y presenta dos isoformas que difieren en su N-terminal y se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma, incluyendo su asociación con membranas y citoesqueleto (Van Etten y col., 1989). Los ratones knock-out de abl y de Arg (Abelson related gen) muestran defecto pleiotrópicos y el doble knock-out muestra un defecto de retardo en el cierre del tubo neural y mal posicionamiento de las células neuroepiteliales en la luz del tubo neural (Koleske y col., 1998). En *Drosophila* abl se localiza en los axones del SNC y un sustrato de abl, Dab (disabled), es letal en heterozigosis con la interrupción de dabl (Gertler y col., 1993). El homólogo de ratón de Dab (mDab-1) juega un papel importante en la correcta laminación de la corteza cerebral, ratón scrambled (Sheldon y col., 1997). Recientemente se ha demostrado que una proteína cables, cuya sobreexpresión inhibe el crecimiento de neuritas, interactúa con c-abl y Cdk-5, promoviendo la fosforilación de Cdk-5 en Y15 por c-abl y activando a esta proteína quinasa (Zukerberg y col., 2000). Cdk-5 se sabe que es esencial para el desarrollo del SNC y se regula por una proteína, p35 (Ko y col., 2001). La subunidad reguladora de Cdk-5 se proteoliza parcialmente a p25 y esta forma proteolizada se acumula en neuronas de pacientes con Enf. de Alzheimer. Esa p25 (p35 parcialmente proteolizada) es muy estable en la célula y produce la activación constitutiva de Cdk-5 que

conduce a la hiperfosforilación de Tau y por tanto contribuye a las alteraciones del citoesqueleto que se observan en las enfermedades neurodegenerativas (Lee y col., 2000; Patrick y col., 1999). El hecho de que c-abl fosforile a α -sinucleína, junto con la no fosforilación de α -sinucleína por Cdk-5 (Nakamura y col., 2001), hace pensar que α -sinucleína se encuentra en una vía paralela a Cdk-5 en la señalización por c-abl; y quizás en relación con la interacción c-abl-Dab1. En cualquier caso quedaría por demostrar las señales extracelulares (ej: factores de crecimiento: NGF, GDNF; BDNF, etc.) que podrían ser responsables de la fosforilación de α -sinucleína por estas proteína tirosina quinasas.

El efecto que sobre la función de α -sinucleína pueda tener la fosforilación por CKI, CKII, GRK2, c-src, c-fyn y c-abl tiene igualmente que ser especulativo por el momento. La introducción de carga negativa en el COOH terminal de α -sinucleína por efecto de la fosforilación evidentemente puede afectar a su capacidad de unión a membranas, de cuyo la fosforilación por GRK2 (S129) disminuye la asociación de α -sinucleína con fosfolípidos, y mayor trascendencia cabría esperar de la fosforilación de α -sinucleína por c-abl puesto que tiene lugar en la región N-terminal (Y39) dentro de las repeticiones anfipáticas por donde se sabe se produce la unión a lípidos (Jensen y col., 1999a). Por otro lado, la fosforilación de la región C-terminal de α -sinucleína puede provocar un cambio en la asociación de α -sinucleína con otras proteínas. En concreto de aquellas proteínas que se ha demostrado que interactúan con α -sinucleína a través del COOH terminal: Tau (Jensen y col., 1999b), MAP1b (Jensen y col., 2000), y la interacción con sinfilina (Kawamata y col., 2001). Aunque en este último caso parece que también juega un papel determinante la interacción con el N-terminal por lo que la fosforilación por c-abl podría modificar la interacción de α -sinucleína con sinfilina (Engelender y col., 1999).

1.4 Efecto de la fosforilación de α -sinucleína sobre la degradación por proteasoma.

Los resultados mostrados en esta tesis muestran que la fosforilación por CKI, CKII, src y abl de α -sinucleína no afectan significativamente a la velocidad de degradación por proteasoma *in vitro*. Este resultado no es sorprendente para aquellas fosforilaciones que tienen lugar en la región C-terminal de α -sinucleína, puesto que esta región no parece ser esencial para el reconocimiento por proteasoma. La no afectación de la degradación por fosforilación por c-abl podría deberse, al menos en parte, al hecho de que sea

subestequiométrica. Por otro lado, el estudio comparativo de la degradación de α -sinucleína silvestre y de los dos mutantes, A30P y A53T, muestra que tampoco hay diferencias significativas entre las tres formas tras fosforilación. Una excepción sería la inhibición de la degradación de la forma mutante A30P tras fosforilación por c-abl que requeriría un estudio más detallado. Aunque estos estudios *in vitro* no pueden ser directamente extrapolados a la situación *in vivo* sugieren que la fosforilación de α -sinucleína no cambia su susceptibilidad intrínseca a la degradación por proteasoma. Ahora bien la situación puede ser distinta *in vivo*, si la fosforilación provoca una disminución (o aumento) de la interacción de α -sinucleína con otras proteínas, de hecho sí que afectaría su degradación por estar provocando una mayor (o menor) disponibilidad de α -sinucleína libre susceptible de degradación por proteasoma.

1.5 Papel de la vía ubiquitina-proteasoma en las sinucleinopatías

Por los resultados presentados en esta tesis y los descritos recientemente por otros autores, se puede formular una hipótesis razonable sobre el papel que juega la vía de degradación ubiquitina-proteasoma en la patogénesis de las sinucleinopatías.

Una proteína α -sinucleína (de función desconocida) se acumula y agrega como consecuencia de un déficit en su degradación. La degradación de α -sinucleína es debida al proteasoma 20S y no requiere previa ubiquitilación (este trabajo). La degradación *in vivo* de α -sinucleína es muy lenta. La larga vida media de α -sinucleína *in vivo* quizás depende de dos factores: su unión a lípidos de membrana y su unión a otras proteínas celulares. Estas interacciones de α -sinucleína con lípidos y otras proteínas impedirían su interacción con el proteasoma, y por tanto su degradación efectiva. La larga vida media de α -sinucleína favorecería su modificación por nitración (Giasson y col., 2000), oxidación (Hashimoto y col., 1999; Paik y col., 2000; Butterfield y Kanski, 2001) y glicosilación (Shimura y col., 2001), determinando su agregación y la formación de los cuerpos de Lewy. Estos agregados de α -sinucleína ya no podrían ser degradados directamente por proteasoma y probablemente la célula intenta la ubiquitilación de α -sinucleína agregada como medida para tratar de señalar estos agregados a degradación. La degradación efectiva de α -sinucleína en las condiciones celulares requeriría su liberación de complejos con otras proteínas y de su asociación con los lípidos de membrana. En este sentido un

trabajo reciente muestra que la sinfilina es degradada por la vía ubiquitina-proteasoma y en este proceso actúa Parkin como E3 específica (Chung y col., 2001). De acuerdo al modelo presentado, la ubiquitilación de sinfilina por Parkin y su degradación por proteasoma 26S liberaría parte de α -sinucleína la cual podría ser objeto de degradación directa por proteasoma 20S. Por otro lado el papel de Parkin como E3 no se limita a la sinfilina, sino que también se requiere para la degradación de Pael-R (parkin associated endothelin receptor), una proteína que retrotranslocada del retículo endoplásmico se acumula en enfermos de PD con la forma juvenil caracterizada por la ausencia de cuerpos de Lewy (Imai y col., 2001).

Experimentos futuros permitirán comprender las diferentes formas en las que la vía ubiquitina-proteasoma participa en la patogénesis de las sinucleinopatías.

Capítulo II

2. PROTEASOMA EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS AUTO-INMUNES

2.1 El proteasoma como autoantígeno en EM

El estudio de pacientes con EM presentado (incluyendo 8 pacientes de USA) muestra una prevalencia de anticuerpos anti-proteasoma de 60% ($65+8/102+8=73/110$) en muestras de suero. Esta prevalencia es mayor que la descrita para autoanticuerpos contra transaldolasa humana 30.8% (29/94) y similar a la de autoanticuerpos contra 2',3'-nucleótido cíclico-3'-fosfodiesterasa 74% (52/70) en pacientes con EM (Colombo y col., 1997; Walsh y Murray, 1998). Anticuerpos anti-proteasoma se detectaron en $8+8/12+8=16/20$ (80%) de las muestras de LCR procedentes de pacientes de EM seropositivos a proteasoma. Esta prevalencia de anticuerpos anti-proteasoma en LCR es similar a la descrita para los autoanticuerpos contra transaldolasa en muestras de LCR de pacientes de EM seropositivos a transaldolasa, (13/17, 76.4%) (Colombo y col., 1997). La prevalencia encontrada de seropositividad contra proteasoma con respecto a la forma clínica de EM fue: 58% en RR-EM (n=59), 50% en PP-EM (n=12) y 80% en SP-EM (n=31); indicando que la presencia de anticuerpos anti-proteasoma no está restringida a un grupo particular de pacientes con EM. Es de destacar que ocho de doce pacientes de EM fueron seropositivos en el momento del primer brote (antes del diagnóstico clínico definitivo), indicando que los anticuerpos anti-proteasoma están presentes muy tempranamente en el curso de la EM (datos no mostrados). Estos resultados, junto con la reactividad mantenida al proteasoma durante periodos prolongados en el curso de la enfermedad, sugieren que la autorreactividad al proteasoma refleja una sensibilización primaria al antígeno y podría servir como un marcador estable a lo largo del curso de la enfermedad.

También se ha mostrado que subunidades recombinantes del proteasoma pueden ser usadas para caracterizar el repertorio de anticuerpos anti-proteasoma de sueros de pacientes con EM, estos resultados demuestran que los principales epítomos reconocidos por estos autoanticuerpos están presentes en la secuencia primaria de las subunidades del proteasoma y no requieren posibles modificaciones que ocurren en la célula eucariótica. El uso de subunidades recombinantes ha permitido mapear los epítomos contra los que van dirigidos los

anticuerpos anti-C2 presentes en suero de pacientes con EM, demostrándose la presencia de un epítipo inmunodominante para células B en los últimos 13 aminoácidos de C-terminal de la subunidad α , C2.

La evidencia de inmunorreactividad de base celular contra proteasoma en pacientes de EM ha sido mostrada por la estimulación específica de la proliferación de células mononucleares de sangre periférica con dos antígenos recombinantes del proteasoma obtenidos en forma soluble (una proteína de fusión de GST con el COOH-terminal de la subunidad C2 y la subunidad C8 del proteasoma). Experimentos preliminares (no mostrados) indicaban que la respuesta proliferativa al proteasoma nativo purificado no era muy significativa, quizás debido a la falta de procesamiento del antígeno (masa molecular nativa 670 kDa). Esta es la razón por la que se decidieron utilizar proteínas recombinantes para estos ensayos de proliferación. La prevalencia total de proliferación positiva (12/30, 40%) y la prevalencia en pacientes seropositivos al proteasoma (12/22, 54%) con las dos subunidades proteasómicas, indican claramente que el proteasoma es también una diana importante para la respuesta autoinmune celular en pacientes con EM. Los datos presentados en la Tabla 3 también muestran que 7 de 12 pacientes de EM seropositivos contra la subunidad C2 presentan proliferación positiva con la construcción GST-C2Ct y 10 de 12 seropositivos contra la subunidad C8 muestra proliferación positiva con la subunidad recombinante C8. Estos resultados indican una buena concordancia entre la respuesta autoinmune humoral y celular contra el proteasoma en pacientes con EM. Además, también cabe destacar que el principal epítipo de la subunidad C2 reconocido por los autoanticuerpos es también un epítipo en la respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica en pacientes con EM. Estos resultados sugieren que ambos tipos de respuestas, células T y B, en estos pacientes con EM van dirigidas contra el mismo epítipo localizado en los últimos 13 aminoácidos de la subunidad C2. Las anteriores consideraciones sugieren que en el mismo paciente se dan ambas respuestas, T y B, contra el proteasoma y como consecuencia ambas pueden contribuir a la respuesta inflamatoria crónica que caracteriza a la EM.

2.2 Respuesta autoinmune a proteasoma y patogénesis de EM

La investigación en enfermedades autoinmune órgano-específicas se ha centrado en la identificación de autoantígenos específicos de órgano. Los autoantígenos que se han considerado importantes en EM, como en otras enfermedades órgano específicas (Diabetes

Melitus dependiente de Insulina tipo I, enfermedad de Graves y miastemia gravis, etc) se piensa que residen específicamente en la mielina del SNC, al ser la mielina y los axones las principales dianas atacadas en esta enfermedad (Steinman, 1996; Noseworthy, 1999; Noseworthy y col., 2000). En este trabajo se ha mostrado que pacientes con EM, aparte de la respuesta inmune contra un sitio extratímico privilegiado (mielina), tienen autoanticuerpos contra proteasoma, un antígeno celular ubicuo también presente en células gliales y neuronas (Mengual y col., 1996). La respuesta anti-proteasoma encontrada en EM es similar a la que previamente hemos descrito en pacientes con LES (Arribas y col., 1991), un prototipo de enfermedad autoinmune sistémica, además la prevalencia de seropositividad contra proteasoma en pacientes con EM (66%, n=110) es mayor que en pacientes con LES (35%, n=100) (chi-cuadrado 21.05, $p < 0.001$). Sorprendentemente, el proteasoma es un antígeno compartido en dos enfermedades autoinmunes tan distintas desde el punto de vista clínico, EM y LES. Estas diferencias no son solo desde el punto de vista clínico, órgano-específica frente a sistémica, sino también desde el punto de vista del mecanismo inmunológico responsable de la enfermedad, respuesta aberrante a antígenos particulares de la mielina frente a alteración en la selección, regulación o supervivencia de las células T y B (Davidson y Diamond, 2001). En este contexto, hay algunos pacientes con LES que presentan síntomas clínicos que se encuentran entre los dos tipos de enfermedades, EM y LES, denominándose "esclerosis lupoide" y realmente se clasifica a estos pacientes como con síndrome desmielinizante asociados a lupus (Tola y col., 1992; Kovacs y col., 2000). Más aún, un trabajo reciente describe la presencia de anticuerpos anti-DNA de alta afinidad como componentes mayoritarios de la respuesta IgG intratecal en pacientes con EM (Williamson y col., 2001), y como es bien sabido los anticuerpos anti-DNA son patognomónicos del LES.

La anterior discusión claramente sugiere que algún tipo de anormalidad global en la función de las células B y/o T, de alguna forma relacionada con lo que ocurre en pacientes con LES, está también implicada en la respuesta inflamatoria crónica que se observa en pacientes con EM, como se observa frecuentemente en otras enfermedades autoinmunes órgano-específicas (Davidson y Diamond, 2001).

Varios mecanismos pueden ser postulados para comprender el papel de la autorreactividad frente al proteasoma en la patogénesis de la EM. La presencia de autoanticuerpos y respuesta T contra proteasoma podría ser un epifenómeno (quizás debido a la muerte celular), apareciendo como resultado de, más que siendo la causa, del proceso

primario autoinmune que ocurre la EM. Sin embargo, la presencia temprana y persistencia de la autorreactividad contra proteasoma es también compatible con que pueda jugar un papel en la agresión inicial y/o durante las recidivas, pudiendo participar a través de la activación del complemento (anticuerpos anti-proteasoma) o por ataque mediado por la respuesta celular anti-proteasoma en la destrucción de la mielina. Como ya se ha mencionado en la introducción, el proteasoma está implicado en la presentación de antígenos por MHC de clase I y datos recientes han demostrado que un péptido derivado de la subunidad C5 del proteasoma es una diana para linfocitos T citotóxicos alorreactivos (Álvarez y col., 2001). Es por tanto posible que en pacientes con EM se encuentren células T autorreactivas (CD8+) que estén reconociendo MHC de clase I cargados con péptidos derivados de subunidades del proteasoma sobre la superficie de oligodendrocitos y pudieran participar en la destrucción de la mielina. Claramente, se requiere mucho más trabajo experimental para poder llegar a entender el papel exacto que la autorreactividad frente al proteasoma pueda jugar en la patogénesis de la EM incluyendo los mecanismos implicados en la pérdida de la tolerancia a este antígeno ubicuo.

En conclusión, la respuesta de anticuerpos y de células T frente a proteasoma es un nuevo marcador para EM. La alta prevalencia y persistencia de los autoanticuerpos anti-proteasoma claramente sugiere su posible utilidad clínica como un nuevo marcador (diagnóstico y/o pronóstico) en esta enfermedad inflamatoria crónica con componentes patogenéticos tan heterogéneos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

En el trabajo presentado en esta tesis se ha abordado el papel del proteasoma como proteasa en las sinucleinopatías y como autoantígeno en la esclerosis múltiple. Las conclusiones más relevantes del trabajo presentado son:

- 1) El proteasoma 20S es responsable de la degradación de α -sinucleína tanto *in vitro* como *in vivo*, no requiriéndose previa ubiquilación. Esta degradación viene mediada por la interacción directa de sinucleína con la subunidad C8 ($\alpha 7$) del proteasoma. La inhibición de la actividad del proteasoma *in vivo* conduce a la agregación citoplasmática de α -sinucleína.
- 2) La α -sinucleína puede ser fosforilada por varias proteína quinasas (CKI, CKII, c-src y c-abl). Esta fosforilación sugiere que la interacción de α -sinucleína con los lípidos de membrana y con otras proteínas puede ser modificada por señales extracelulares.
- 3) Las mutaciones puntuales de α -sinucleína, A30P y A53T, encontradas en formas familiares de Enfermedad de Parkinson se comportan como la α -sinucleína silvestre respecto a la susceptibilidad a: degradación por proteasoma, fosforilación por las proteína quinasas CKI, CKII, c-src y c-abl, y degradación por proteasoma previa fosforilación por proteína quinasas anteriormente mencionadas.
- 4) La larga vida media de α -sinucleína sugiere que *in vivo* su interacción con lípidos de membrana y con otras proteínas prevendría su degradación por proteasoma favoreciendo la modificación de α -sinucleína por nitración, oxidación, etc y eventualmente su agregación y la formación de los cuerpos de Lewy.
- 5) La presencia de autoanticuerpos y células T autoreactivas frente a proteasoma es un nuevo marcador de la Esclerosis Múltiple. La alta prevalencia y persistencia de los autoanticuerpos anti-proteasoma en pacientes con Esclerosis Múltiple sugieren su utilidad clínica para el diagnóstico y/o pronóstico de esta enfermedad inflamatoria crónica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abeliovich,A., Schmitz,Y., Farinas,I., Choi-Lundberg,D., Ho,W.H., Castillo,P.E., Shinsky,N., Verdugo,J.M., Armanini,M., Ryan,A., Hynes,M., Phillips,H., Sulzer,D., and Rosenthal,A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239-252.
- Alvarez,I., Sesma,L., Marcilla,M., Ramos,M., Marti,M., Camafeita,E., and Lopez De Castro,J.A. (2001). Identification of novel HLA-B27 ligands derived from polymorphic regions of its own or other class I molecules based on direct generation by 20S proteasome. *J Biol. Chem.*
- Ancolio,K., Alves,d.C., Ueda,K., and Checler,F. (2000). Alpha-synuclein and the Parkinson's disease-related mutant Ala53Thr- alpha-synuclein do not undergo proteasomal degradation in HEK293 and neuronal cells. *Neurosci. Lett.* 285, 79-82.
- Arribas,J., Arizti,P., and Castano,J.G. (1994). Antibodies against the C2 COOH-terminal region discriminate the active and latent forms of the multicatalytic proteinase complex. *J Biol Chem* 269, 12858-12864.
- Arribas,J. and Castano,J.G. (1990). Kinetic studies of the differential effect of detergents on the peptidase activities of the multicatalytic proteinase from rat liver. *J Biol Chem* 265, 13969-13973.
- Arribas,J. and Castaño,J.G. (1993). A comparative study of the chymotrypsin-like activity of the rat liver multicatalytic proteinase and the ClpP from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 268, 21165-21171.
- Arribas,J., Luz-Rodriguez,M., Alvarez-Do-Forno,R., and Castaño,J.G. (1991). Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 173, 423-427.
- Baba,M., Nakajo,S., Tu,P.H., Tomita,T., Nakaya,K., Lee,V.M., Trojanowski,J.Q., and Iwatsubo,T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J Pathol* 152, 879-884.
- Baskaran,R., Dahmus,M.E., and Wang,J.Y. (1993). Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl- terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 11167-11171.
- Beal,M.F. (2001). Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 325-334.
- Bennett,M.C., Bishop,J.F., Leng,Y., Chock,P.B., Chase,T.N., and Mouradian,M.M. (1999). Degradation of alpha-synuclein by proteasome. *J Biol. Chem.* 274, 33855-33858.
- Bercovich,B., Stancovski,I., Mayer,A., Blumenfeld,N., Laszlo,A., Schwartz,A.L., and Ciechanover,A. (1997). Ubiquitin-dependent degradation of certain protein substrates in vitro requires the molecular chaperone Hsc70. *J Biol. Chem.* 272, 9002-9010.

- Bochtler,M., Ditzel,L., Groll,M., Hartmann,C., and Huber,R. (1999). The proteasome. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 295-317.
- Braun,B.C., Glickman,M., Kraft,R., Dahlmann,B., Kloetzel,P.M., Finley,D., and Schmidt,M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* 1, 221-226.
- Bruening,W., Giasson,B.I., Klein-Szanto,A.J., Lee,V.M., Trojanowski,J.Q., and Godwin,A.K. (2000). Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary. *Cancer* 88, 2154-2163.
- Bukau,B. and Horwich,A.L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- Bussell,R. and Eliezer,D. (2001). Residual structure and dynamics in Parkinson's disease associated mutants of {alpha}-synuclein. *J Biol. Chem.*
- Butterfield,D.A. and Kanski,J. (2001). Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech. Ageing Dev.* 122, 945-962.
- Byrd,C., Turner,G.C., and Varshavsky,A. (1998). The N-end rule pathway controls the import of peptides through degradation of a transcriptional repressor. *EMBO J* 17, 269-277.
- Castaño,J.G., Mahillo,E., Arizti,P., and Arribas,J. (1996). Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry* 35, 3782-3789.
- Chu-Ping,M., Slaughter,C.A., and DeMartino,G.N. (1992). Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). *Biochim. Biophys. Acta* 1119, 303-311.
- Chung,K.K., Zhang,Y., Lim,K.L., Tanaka,Y., Huang,H., Gao,J., Ross,C.A., Dawson,V.L., and Dawson,T.M. (2001). Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat. Med.* 7, 1144-1150.
- Clayton,D.F. and George,J.M. (1998). The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 21, 249-254.
- Conway,K.A., Harper,J.D., and Lansbury,P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* 4, 1318-1320.
- Colombo,E., Banki,K., Tatum,A.H., Daucher,J., Ferrante,P., Murray,R.S., Phillips,P.E., and Perl,A. (1997). Comparative analysis of antibody and cell-mediated autoimmunity

- to transaldolase and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest* 99, 1238-1250.
- Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T., Jr. (2000a). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39, 2552-2563.
- Conway, K.A., Lee, S.J., Rochet, J.C., Ding, T.T., Williamson, R.E., and Lansbury, P.T., Jr. (2000b). Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 571-576.
- Corish, P. and Tyler-Smith, C. (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng* 12, 1035-1040.
- Davidson, A. and Diamond, B. (2001). Autoimmune diseases. *N. Engl. J. Med.* 345, 340-350.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273, 9443-9449.
- Desdoutis, F., Cohen, D., Nairn, A.C., Greengard, P., and Girault, J.A. (1995). Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase I in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 8772-8778.
- Diaz-Villoslada, P., Shih, A., Shao, L., Genain, C.P., and Hauser, S.L. (1999). Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen. *J. Neuroimmunol.* 99, 36-43.
- Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., Jr., and Browne, G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* 307, 1061-1073.
- Ellis, C.E., Schwartzberg, P.L., Grider, T.L., Fink, D.W., and Nussbaum, R.L. (2001). alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 276, 3879-3884.
- Engelender, S., Kaminsky, Z., Guo, X., Sharp, A.H., Amaravi, R.K., Kleiderlein, J.J., Margolis, R.L., Troncoso, J.C., Lanahan, A.A., Worley, P.F., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (1999). Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat. Genet.* 22, 110-114.
- Fabunmi, R.P., Wigley, W.C., Thomas, P.J., and DeMartino, G.N. (2000). Activity and regulation of the centrosome-associated proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 409-413.
- Feany, M.B. and Bender, W.W. (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* 404, 394-398.

- Feder, D. and Bishop, J.M. (1990). Purification and enzymatic characterization of pp60c-src from human platelets. *J Biol. Chem.* 265, 8205-8211.
- Feder, M.E. and Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243-282.
- Fergusson, J., Landon, M., Lowe, J., Dawson, S.P., Layfield, R., Hanger, D.P., and Mayer, R.J. (1996). Pathological lesions of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies brains exhibit immunoreactivity to an ATPase that is a regulatory subunit of the 26S proteasome. *Neurosci. Lett.* 219, 167-170.
- Frydman, J. and Hartl, F.U. (1996). Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms. *Science* 272, 1497-1502.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E.J., and Sztul, E.S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP- chimera. *J Cell Biol.* 146, 1239-1254.
- Garcia, P., Shoelson, S.E., George, S.T., Hinds, D.A., Goldberg, A.R., and Miller, W.T. (1993). Phosphorylation of synthetic peptides containing Tyr-Met-X-Met motifs by nonreceptor tyrosine kinases in vitro. *J Biol. Chem.* 268, 25146-25151.
- Gasser, T. (2001). Molecular genetics of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 86, 23-32.
- George, J.M., Jin, H., Woods, W.S., and Clayton, D.F. (1995). Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15, 361-372.
- Gertler, F.B., Hill, K.K., Clark, M.J., and Hoffmann, F.M. (1993). Dosage-sensitive modifiers of *Drosophila* abl tyrosine kinase function: prospero, a regulator of axonal outgrowth, and disabled, a novel tyrosine kinase substrate. *Genes Dev.* 7, 441-453.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985-989.
- Giasson, B.I., Murray, I.V., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2001). A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol. Chem.* 276, 2380-2386.
- Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73-82.
- Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 492-501.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1062-1067.

- Goff,S.P., Gilboa,E., Witte,O.N., and Baltimore,D. (1980). Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell* 22, 777-785.
- Groll,M., Ditzel,L., Lowe,J., Stock,D., Bochtler,M., Bartunik,H.D., and Huber,R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 angstrom resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Groll,M., Heinemeyer,W., Jager,S., Ullrich,T., Bochtler,M., Wolf,D.H., and Huber,R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10976-10983.
- Gross,S.D., Hoffman,D.P., Fiset,P.L., Baas,P., and Anderson,R.A. (1995). A phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-sensitive casein kinase I alpha associates with synaptic vesicles and phosphorylates a subset of vesicle proteins. *J Cell Biol.* 130, 711-724.
- Hardy,J. and Gwinn-Hardy,K. (1998). Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 282, 1075-1079.
- Harhangi,B.S., Farrer,M.J., Lincoln,S., Bonifati,V., Meco,G., De Michele,G., Brice,A., Durr,A., Martinez,M., Gasser,T., Bereznoi,B., Vaughan,J.R., Wood,N.W., Hardy,J., Oostra,B.A., and Breteler,M.M. (1999). The Ile93Met mutation in the ubiquitin carboxy-terminal-hydrolase-L1 gene is not observed in European cases with familial Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270, 1-4.
- Hashimoto,M., Hsu,L.J., Xia,Y., Takeda,A., Sisk,A., Sundsmo,M., and Masliah,E. (1999). Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP/alpha-synuclein in vitro. *Neuroreport* 10, 717-721.
- Hershko,A. and Ciechanover,A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem* 67, 425-479.
- Hong,L., Ko,H.W., Gwag,B.J., Joe,E., Lee,S., Kim,Y.T., and Suh,Y.H. (1998). The cDNA cloning and ontogeny of mouse alpha-synuclein. *Neuroreport* 9, 1239-1243.
- Ii,K., Ito,H., Tanaka,K., and Hirano,A. (1997). Immunocytochemical co-localization of the proteasome in ubiquitinated structures in neurodegenerative diseases and the elderly. *J Neuropathol. Exp Neurol.* 56, 125-131.
- Imai,Y., Soda,M., Inoue,H., Hattori,N., Mizuno,Y., and Takahashi,R. (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105, 891-902.
- Iwata,A., Maruyama,M., Kanazawa,I., and Nukina,N. (2001b). Alpha-synuclein affects the MAP kinase pathway and accelerates cell death. *J Biol. Chem.*
- Iwata,A., Miura,S., Kanazawa,I., Sawada,M., and Nukina,N. (2001a). alpha-Synuclein forms a complex with transcription factor Elk-1. *J Neurochem.* 77, 239-252.

- Jenco, J.M., Rawlingson, A., Daniels, B., and Morris, A.J. (1998). Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by a. *Biochemistry* 37, 4901-4909.
- Jensen, P.H., Hager, H., Nielsen, M.S., Hojrup, P., Gliemann, J., and Jakes, R. (1999b). alpha-synuclein binds to Tau and stimulates the protein kinase A-catalyzed tau phosphorylation of serine residues 262 and 356. *J Biol. Chem.* 274, 25481-25489.
- Jensen, P.H., Islam, K., Kenney, J., Nielsen, M.S., Power, J., and Gai, W.P. (2000). Microtubule-associated protein 1B is a component of cortical Lewy bodies and binds alpha-synuclein filaments. *J Biol. Chem.* 275, 21500-21507.
- Jensen, P.H., Li, J.Y., Dahlstrom, A., and Dotti, C.G. (1999a). Axonal transport of synucleins is mediated by all rate components. *Eur. J Neurosci.* 11, 3369-3376.
- Jensen, P.H., Nielsen, M.S., Jakes, R., Dotti, C.G., and Goedert, M. (1998). Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J Biol. Chem.* 273, 26292-26294.
- Jensen, P.H., Sorensen, E.S., Petersen, T.E., Gliemann, J., and Rasmussen, L.K. (1995). Residues in the synuclein consensus motif of the alpha-synuclein fragment, NAC, participate in transglutaminase-catalyzed cross-linking to Alzheimer-disease amyloid beta A4 peptide. *Biochem. J* 310 (Pt 1), 91-94.
- Jo, E., McLaurin, J., Yip, C.M., George-Hyslop, P., and Fraser, P.E. (2000). alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J Biol. Chem.* 275, 34328-34334.
- Johansen, J.W. and Ingebritsen, T.S. (1986). Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by pp60v-src. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 207-211.
- Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998b). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143, 1883-1898.
- Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998a). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 143, 1883-1898.
- Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Muller, V., Jacobsen, H., Schindzielorz, A., Okochi, M., Leimer, U., van der, P.H., Probst, A., Kremmer, E., Kretschmar, H.A., and Haass, C. (2000). Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci.* 20, 6365-6373.
- Kawamata, H., McLean, P.J., Sharma, N., and Hyman, B.T. (2001). Interaction of alpha-synuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. *J Neurochem.* 77, 929-934.
- 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.

- Kloetzel, P.M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179-187.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R.T., Takahashi, S., Kulkarni, A.B., Li, E., and Tsai, L.H. (2001). p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment. *J Neurosci.* 21, 6758-6771.
- Koleske, A.J., Gifford, A.M., Scott, M.L., Nee, M., Bronson, R.T., Miczek, K.A., and Baltimore, D. (1998). Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron* 21, 1259-1272.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 524-530.
- Kovacs, B., Lafferty, T.L., Brent, L.H., and DeHoratius, R.J. (2000). Transverse myelopathy in systemic lupus erythematosus: an analysis of 14 cases and review of the literature. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 120-124.
- Kroll, M., Conconi, M., Desterro, M.J., Marin, A., Thomas, D., Friguet, B., Hay, R.T., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., and Rodriguez, M.S. (1997). The carboxy-terminus of I kappaB alpha determines susceptibility to degradation by the catalytic core of the proteasome. *Oncogene* 15, 1841-1850.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, D.H., Sherman, M.Y., and Goldberg, A.L. (1996). Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16, 4773-4781.
- Lee, F.J., Liu, F., Pristupa, Z.B., and Niznik, H.B. (2001). Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *FASEB J* 15, 916-926.
- Lee, M.S., Kwon, Y.T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R.M., and Tsai, L.H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-364.
- Li, J., Uversky, V.N., and Fink, A.L. (2001). Effect of Familial Parkinson's Disease Point Mutations A30P and A53T on the Structural Properties, Aggregation, and Fibrillation of Human alpha-Synuclein. *Biochemistry* 40, 11604-11613.
- Lowe, J., McDermott, H., Landon, M., Mayer, R.J., and Wilkinson, K.D. (1990). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J Pathol* 161, 153-160.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268, 533-539.

- Lublin,F.D. and Reingold,S.C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907-911.
- Lucas,J., Lobo,D., Terry,E., Hogan,E.L., and Banik,N.L. (1992). Susceptibility of myelin proteins to a neutral endoproteinase: the degradation of myelin basic protein (MBP) and P2 protein by purified bovine brain multicatalytic proteinase complex (MPC). *Neurochem. Res.* 17, 1261-1266.
- Lucking,C.B. and Brice,A. (2000). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 1894-1908.
- Maraganore,D.M., Farrer,M.J., Hardy,J.A., Lincoln,S.J., McDonnell,S.K., and Rocca,W.A. (1999). Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology* 53, 1858-1860.
- Maroteaux,L., Campanelli,J.T., and Scheller,R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci.* 8, 2804-2815.
- Masliah,E., Rockenstein,E., Veinbergs,I., Mallory,M., Hashimoto,M., Takeda,A., Sagara,Y., Sisk,A., and Mucke,L. (2000). Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 287, 1265-1269.
- Matsuoka,Y., Vila,M., Lincoln,S., McCormack,A., Picciano,M., LaFrancois,J., Yu,X., Dickson,D., Langston,W.J., McGowan,E., Farrer,M., Hardy,J., Duff,K., Przedborski,S., and Di Monte,D.A. (2001). Lack of nigral pathology in transgenic mice expressing human alpha- synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol. Dis.* 8, 535-539.
- Mayo,I., Arizti,P., Pares,A., Oliva,J., Doforno,R.A., de Sagarra,M.R., Rodes,J., and Castaño,J.G. (2000). Antibodies against the COOH-terminal region of E. coli ClpP protease in patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 33, 528-536.
- McLean,P.J., Kawamata,H., and Hyman,B.T. (2001). Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience* 104, 901-912.
- McLean,P.J., Ribich,S., and Hyman,B.T. (2000). Subcellular localization of alpha-synuclein in primary neuronal cultures: effect of missense mutations. *J Neural Transm. Suppl* 53-63.
- Mengual,E., Arizti,P., Rodrigo,J., Gimenezamaya,J.M., and Castano,J.G. (1996). Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. *J Neurosci.* 16, 6331-6341.

- McDonald,W.I., Compston,A., Edan,G., Goodkin,D., Hartung,H.P., Lublin,F.D., Mcfarland,H.F., Paty,D.W., Polman,C.H., Reingold,S.C., Sandberg-Wollheim,M., Sibley,W., Thompson,A., van den,N.S., Weinshenker,B.Y., and Wolinsky,J.S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121-127.
- McKeith,I.G. (2000). Clinical Lewy body syndromes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 1-8.
- Murphy,D.D., Rueter,S.M., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J Neurosci.* 20, 3214-3220.
- Nakajo,S., Tsukada,K., Omata,K., Nakamura,Y., and Nakaya,K. (1993). A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein. Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation. *Eur. J Biochem.* 217, 1057-1063.
- Nakamura,T., Yamashita,H., Takahashi,T., and Nakamura,S. (2001). Activated Fyn phosphorylates alpha-synuclein at tyrosine residue 125. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 1085-1092.
- Narhi,L., Wood,S.J., Steavenson,S., Jiang,Y., Wu,G.M., Anafi,D., Kaufman,S.A., Martin,F., Sitney,K., Denis,P., Louis,J.C., Wypych,J., Biere,A.L., and Citron,M. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol. Chem.* 274, 9843-9846.
- Noseworthy,J.H. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399, A40-A47.
- Noseworthy,J.H., Lucchinetti,C., Rodriguez,M., and Weinshenker,B.G. (2000). Multiple sclerosis. *N. Engl. J Med.* 343, 938-952.
- Okochi,M., Walter,J., Koyama,A., Nakajo,S., Baba,M., Iwatsubo,T., Meijer,L., Kahle,P.J., and Haass,C. (2000). Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. *J Biol. Chem.* 275, 390-397.
- Orlowski,M. (1990). The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 29, 10289-10297.
- Ostrerova,N., Petrucelli,L., Farrer,M., Mehta,N., Choi,P., Hardy,J., and Wolozin,B. (1999). alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci.* 19, 5782-5791.
- Paik,S.R., Shin,H.J., and Lee,J.H. (2000). Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein in the presence of Copper(II) and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 378, 269-277.
- Patrick,G.N., Zukerberg,L., Nikolic,M., de la,M.S., Dikkes,P., and Tsai,L.H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-622.

- Pereira, M.E., Nguyen, T., Wagner, B.J., Margolis, J.W., Yu, B., and Wilk, S. (1992). 3,4-dichloroisocoumarin-induced activation of the degradation of beta-casein by the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex. *J Biol Chem* 267, 7949-7955.
- Perrin, R.J., Woods, W.S., Clayton, D.F., and George, J.M. (2000). Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis. *J Biol. Chem.* 275, 34393-34398.
- Petersen, K., Olesen, O.F., and Mikkelsen, J.D. (1999). Developmental expression of alpha-synuclein in rat hippocampus and cerebral cortex. *Neuroscience* 91, 651-659.
- Polymeropoulos, M.H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S.E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E.S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W.G., Lazzarini, A.M., Duvoisin, R.C., Di Iorio, G., Golbe, L.I., and Nussbaum, R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045-2047.
- Pronin, A.N., Morris, A.J., Surguchov, A., and Benovic, J.L. (2000). Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol. Chem.* 275, 26515-26522.
- Rathke-Hartlieb, S., Kahle, P.J., Neumann, M., Ozmen, L., Haid, S., Okochi, M., Haass, C., and Schulz, J.B. (2001). Sensitivity to MPTP is not increased in Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein transgenic mice. *J Neurochem.* 77, 1181-1184.
- Rechsteiner, M., Realini, C., and Ustrell, V. (2000). The proteasome activator 11 S REG (PA28) and Class I antigen presentation. *Biochem. J.* 345, 1-15.
- Ren, R., Ye, Z.S., and Baltimore, D. (1994). Abl protein-tyrosine kinase selects the Crk adapter as a substrate using SH3-binding sites. *Genes Dev.* 8, 783-795.
- Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.
- Rodriguez-Vilarino, S., Arribas, J., Arizti, P., and Castaño, J.G. (2000). Proteolytic Processing and Assembly of the C5 Subunit into the Proteasome Complex. *J. Biol. Chem.* 275, 6592-6599.
- Rosen, M.K., Yamazaki, T., Gish, G.D., Kay, C.M., Pawson, T., and Kay, L.E. (1995). Direct demonstration of an intramolecular SH2-phosphotyrosine interaction in the Crk protein. *Nature* 374, 477-479.
- Ruiz-de-Mena, I., Mahillo, E., Arribas, J., and Castaño, J.G. (1993). Kinetic mechanism of activation by cardiolipin (diphosphatidylglycerol) of the rat liver multicatalytic proteinase. *Biochem J* 296, 93-97.
- Russell, S.J., Reed, S.H., Huang, W., Friedberg, E.C., and Johnston, S.A. (1999). The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell* 3, 687-695.

- Sawyers,C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J Med.* 340, 1330-1340.
- Sheldon,M., Rice,D.S., D'Arcangelo,G., Yoneshima,H., Nakajima,K., Mikoshiba,K., Howell,B.W., Cooper,J.A., Goldowitz,D., and Curran,T. (1997). Scrambler and yotari disrupt the disabled gene and produce a reeler- like phenotype in mice. *Nature* 389, 730-733.
- Sherman,M.Y. and Goldberg,A.L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.
- Shimura,H., Schlossmacher,M.G., Hattori,N., Frosch,M.P., Trockenbacher,A., Schneider,R., Mizuno,Y., Kosik,K.S., and Selkoe,D.J. (2001). Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science* 293, 263-269.
- Songyang,Z., Shoelson,S.E., Chaudhuri,M., Gish,G., Pawson,T., Haser,W.G., King,F., Roberts,T., Ratnofsky,S., Lechleider,R.J., and . (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72 , 767-778.
- Specht,C.G. and Schoepfer,R. (2001). Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC. Neurosci.* 2, 11.
- Spillantini,M.G., Crowther,R.A., Jakes,R., Hasegawa,M., and Goedert,M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 6469-6473.
- Spillantini,M.G., Schmidt,M.L., Lee,V.M., Trojanowski,J.Q., Jakes,R., and Goedert,M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840.
- Steinman,L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 85, 299-302.
- Strickland,E., Hakala,K., Thomas,P.J., and DeMartino,G.N. (2000). Recognition of misfolding proteins by PA700, the regulatory subcomplex of the 26 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 275, 5565-5572.
- Sudhof,T.C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.
- Takeda,A., Mallory,M., Sundsmo,M., Honer,W., Hansen,L., and Masliah,E. (1998). Abnormal accumulation of NACP/alpha-synuclein in neurodegenerative disorders. *Am. J Pathol* 152, 367-372.
- Tola,M.R., Granieri,E., Caniatti,L., Paolino,E., Monetti,C., Dovigo,L., Scolozzi,R., De Bastiani,P., and Carreras,M. (1992). Systemic lupus erythematosus presenting with neurological disorders. *J Neurol.* 239, 61-64.

- Touitou,R., Richardson,J., Bose,S., Nakanishi,M., Rivett,J., and Allday,M.J. (2001). A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J.* 20, 2367-2375.
- Trojanowski,J.Q. and Lee,V.M. (1998). Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch. Neurol.* 55, 151-152.
- Smith,D.B. and Johnson,K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Ueda,K., Fukushima,H., Masliah,E., Xia,Y., Iwai,A., Yoshimoto,M., Otero,D.A., Kondo,J., Ihara,Y., and Saitoh,T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 11282-11286.
- Uversky,V.N., Lee,H.J., Li,J., Fink,A.L., and Lee,S.J. (2001). Stabilization of partially folded conformation during {alpha}-synuclein oligomerization in both purified and cytosolic preparations. *J Biol. Chem.*
- van der,P.H., Wiederhold,K.H., Probst,A., Barbieri,S., Mistl,C., Danner,S., Kauffmann,S., Hofele,K., Spoonen,W.P., Rugg,M.A., Lin,S., Caroni,P., Sommer,B., Tolnay,M., and Bilbe,G. (2000). Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci.* 20, 6021-6029.
- Van Etten,R.A., Jackson,P., and Baltimore,D. (1989). The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell* 58, 669-678.
- Varshavsky,A. (1995). The N-end rule. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. B.* 60, 461-478.
- Varshavsky,A., Turner,G., Du,F., and Xie,Y. (2000). The ubiquitin system and the N-end rule pathway [In Process Citation]. *Biol. Chem.* 381, 779-789.
- Verny,M. and Duyckaerts,C. (1998). Dementia with Lewy bodies. *Ann. Med. Interne (Paris)* 149, 209-215.
- Voges,D., Zwickl,P., and Baumeister,W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015-1068.
- Walsh,M.J. and Murray,J.M. (1998). Dual implication of 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase as major autoantigen and C3 complement-binding protein in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest* 101, 1923-1931.
- Weinreb,P.H., Zhen,W., Poon,A.W., Conway,K.A., and Lansbury,P.T., Jr. (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709-13715.

- Wigley, W.C., Fabunmi, R.P., Lee, M.G., Marino, C.R., Muallem, S., DeMartino, G.N., and Thomas, P.J. (1999). Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome. *J. Cell Biol.* 145, 481-490.
- Williamson, R.A., Burgoon, M.P., Owens, G.P., Ghausi, O., Leclerc, E., Firme, L., Carlson, S., Corboy, J., Parren, P.W., Sanna, P.P., Gilden, D.H., and Burton, D.R. (2001). Anti-DNA antibodies are a major component of the intrathecal B cell response in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 1793-1798.
- Wood, S.J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J.C., Citron, M., and Biere, A.L. (1999). alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol. Chem.* 274, 19509-19512.
- Yang, F., Liu, Y., Bixby, S.D., Friedman, J.D., and Shokat, K.M. (1999). Highly efficient green fluorescent protein-based kinase substrates. *Anal. Biochem.* 266, 167-173.
- Zaiss, D.M., Standera, S., Holzhutter, H., Kloetzel, P., and Sijts, A.J. (1999). The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. *FEBS Lett.* 457, 333-338.
- Zukerberg, L.R., Patrick, G.N., Nikolic, M., Humbert, S., Wu, C.L., Lanier, L.M., Gertler, F.B., Vidal, M., Van Etten, R.A., and Tsai, L.H. (2000). Cables links Cdk5 and c-Abl and facilitates Cdk5 tyrosine phosphorylation, kinase upregulation, and neurite outgrowth. *Neuron* 26, 633-646.
- Zugaro, L.M., Reid, G.E., Ji, H., Eddes, J.S., Murphy, A.C., Burgess, A.W., and Simpson, R.J. (1998). Characterization of rat brain stathmin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis-matrix assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization trap mass spectrometry. *Electrophoresis* 19, 867-876.

ANEXO

Otros artículos publicados durante el desarrollo de la tesis:

de Sagarra, M.R., **Mayo, I.**, Marco, S., Rodríguez-Vilariño, S., Oliva, J., Carrascosa, J.L., Castaño, J.G., (1999) Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human of *E. Coli* ClpP. *J.Mol.Biol.* 292:819-825.

Mayo, I., Arizti, P., Parés, A., Oliva, J., Alvarez Doforno, R., de Sagarra, R., Rodés, J., Castaño, J.G. (2000) Antibodies against the COOH-terminal region of *E.coli* ClpP protease in patients with primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* 33:528-536.

JMB



**Mitochondrial Localization and Oligomeric Structure
of HClpP, the Human Homologue of *E. coli* ClpP**

**María Rosa de Sagarra, Isabel Mayo, Sergio Marco Susana Rodríguez-
Vilariño, Joaquín Oliva, José L. Carrascosa and José G. Castaño**

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
5780 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637
TEL: 773-936-3700
FAX: 773-936-3701
WWW: WWW.CHEM.UCHICAGO.EDU

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DIVISION OF THE PHYSICAL SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
5780 SOUTH CAMPUS DRIVE
CHICAGO, ILLINOIS 60637
TEL: 773-936-3700
FAX: 773-936-3701
WWW: WWW.CHEM.UCHICAGO.EDU

Mitochondrial Localization and Oligomeric Structure of HClpP, the Human Homologue of *E. coli* ClpP

María Rosa de Sagarra¹, Isabel Mayo¹, Sergio Marco²
Susana Rodríguez-Vilariño¹, Joaquín Oliva¹, José L. Carrascosa²
and José G. Castaño^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols". UAM-CSIC, Facultad de Medicina UAM, 28029, Madrid Spain

²Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus de la Universidad Autónoma Cantoblanco, 28049, Madrid Spain

A bacterially expressed recombinant HClpP protein, the human homologue of *Escherichia coli* ClpP protease, was used to obtain specific polyclonal antibodies. Those antibodies identify a 26 kDa polypeptide in mitochondrial subcellular fractions of rat and human liver. Immunofluorescence and electron microscopic studies demonstrate that the mammalian homologue of ClpP is located in the mitochondrial matrix with a tendency to be found in association with the inner mitochondrial membrane. An HClpP recombinant protein with a truncated NH₂ terminus (missing the first 58 amino acid residues) shows a molecular mass of 26 kDa under denaturing conditions. This N-truncated HClpP recombinant protein shows a native molecular mass of 340 kDa that is identical with the native molecular mass of the partially purified protein from rat liver mitochondria. Electron microscopy shows that the N-truncated recombinant HClpP has a ring shape with seven identical morphological units in the periphery, exhibiting a 7-fold symmetry. The native molecular mass and the electron microscopic studies suggest that mitochondrial ClpP is composed of two heptameric rings with 7-fold symmetry, similar to *E. coli* ClpP.

© 1999 Academic Press

*Corresponding author

Keywords: ClpP; mammalian; mitochondria; rotational symmetry; protease

Introduction

Protein degradation is carried out by protein complexes such as the proteasomes of eukaryotes, eubacteria and archae and other ATP-dependent proteases of eubacterial cells (Larsen & Finley, 1997). *Escherichia coli* produces at least three ATP-dependent proteases (Gottesman, 1996), Lon (La), Clp (Ti) and HslV (ClpQ, similar to proteasomal β -subunits). Clp protease consists of a proteolytic component, ClpP, in association with an ATP-hydrolyzing, chaperonin-like component, ClpA or ClpX (Gottesman *et al.*, 1997a,b). ClpP, the proteolytic component of the ATP-dependent ClpAP protease, is composed of 14 identical subunits and has intrinsic peptidase activity against short peptides (Katayama *et al.*, 1988; Arribas & Castaño, 1993; Thompson *et al.*, 1994). Degradation of proteins and some peptides by ClpP requires the

regulatory component ClpA/X and ATP (Thompson & Maurizi, 1994; Gottesman *et al.*, 1993, 1998; Wawrzynow *et al.*, 1995). The crystal structure of the proteolytic component of the Clp protease from *E. coli* at 2.3 Å resolution has been determined (Wang *et al.*, 1997, 1998). The active protease resembles a hollow, solid-walled cylinder composed of two 7-fold symmetric rings. The structure of the entrance pores and proteolytic chamber in ClpP are strikingly similar to those observed in the β -proteolytic rings of yeast and *Thermoplasma acidophilum* proteasome and in the *E. coli* HslV (Wang *et al.*, 1998). The ClpP protease is widely distributed among bacteria and also in chloroplasts of different plant species (Maurizi *et al.*, 1990; Clarke *et al.*, 1994; Shanklin *et al.*, 1995). No homologue of *E. coli* ClpP (EClpP) has been detected in the yeast genome, but a homologue was deduced from *Caenorhabditis elegans* genome sequencing project (EMBL, accession number Z49073). In humans, Bross *et al.* (1995) described the cloning of the cDNA of a human homologue of EClpP, HClpP (53% identical with EClpP), containing an N-terminal extension whose sequence is typical of mito-

Abbreviations used: EClpP, *E. coli* ClpP; HClpP, human ClpP; EST, expressed sequence tag; mitClpP, mitochondrial ClpP.

E-mail address of the corresponding author: oseg.castano@uam.es

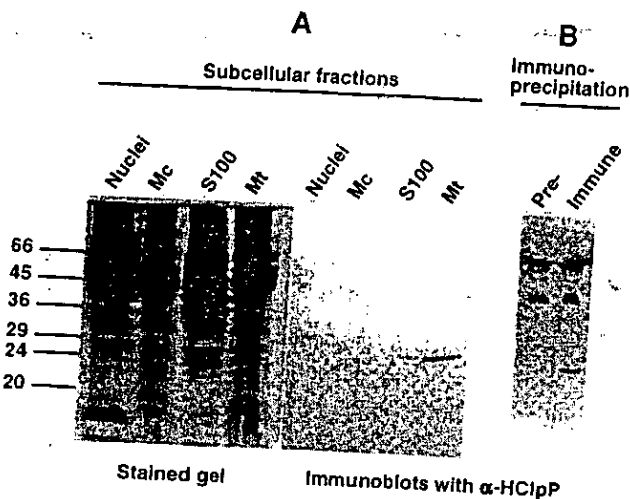


Figure 1. An antibody against recombinant HClpP recognizes a 26 kDa polypeptide of liver mitochondria by immunoblot and immunoprecipitation. (a) Immunoblot analysis of rat liver subcellular fractions with anti-HClpP antibodies. (b) Soluble rat liver mitochondrial proteins were immunoprecipitated with pre-immune or immune sera and the immunoprecipitates analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-HClpP antibodies.

chondrial targeting peptides. Recently, the same group (Corydon *et al.*, 1998) reported that cells transfected with the full-length HClpP cDNA synthesized a precursor of 39-37 kDa converted to a 32 kDa protein that shows a mobility in SDS-PAGE similar to the product of an *E. coli* expressed HClpP protein in which the 56 N-terminal residues had been deleted. They also showed precursor import into mitochondria in a reconstituted system and using immunofluorescence, with antibodies against the HClpP, the protein expressed from the transfected cDNA was located in mitochondria.

Here, we show for the first time that the HClpP is localized within mitochondrial matrix and demonstrate that the HClpP is an oligomer composed of a single polypeptide of 26 kDa with a native molecular mass of 340 kDa having a donut-shape with a 7-fold symmetry axis, similar to the *E. coli* ClpP.

Results

Identification of mitClpP and localization by immunofluorescence and electron microscopic studies

We obtained a polyclonal antibody against purified recombinant R1HClpP (see the construct details in Material and Methods and in Figure 4). Subcellular fractionation studies of rat liver demonstrate that those antibodies recognize a single polypeptide of 26 kDa (Figure 1(a)) mainly present in the mitochondrial fraction (similar results were obtained with human liver: data not shown). For the controls of the subcellular fractionation procedure, we probed similar blots with antibodies to protein disulfide isomerase (Nieto *et al.*, 1990), a luminal protein of the endoplasmic reticulum, resulting in the exclusive detection of this 57 kDa protein in the microsomal fraction. We also probed the blots with sera from patients with primary biliary cirrhosis that have antibodies against the E2 and E1 components of mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex, resulting in the exclusive detection of the corresponding 72 and 41 kDa polypeptides in the mitochondrial fraction (data not shown). Furthermore, the anti-HClpP specific antibodies immunoprecipitate a polypeptide of 26 kDa (Figure 1(b)) under native conditions from a total soluble mitochondrial fraction. The polypeptide of 50 kDa present in the immunoblot (Figure 1(b)) is totally non-specific, it is observed when only the secondary anti-rabbit antibody is used and corresponded to some IgG heavy chain probably released during gel running.

The subcellular fractionation studies already suggested that the mammalian homologue of EClpP is located in mitochondria. To confirm this suggestion we performed indirect immunofluorescence studies. Figure 2 shows double staining of NRK cells with anti-HClpP antibodies (green fluorescence) and Mitotrack (red fluorescence). The merge (Figure 2(c)) shows that the antibodies detected the ClpP in mitochondria. Similar results were obtained with HeLa cells (data not shown). Furthermore, we performed immune electron microscopy of rat liver mitochondria (Figure 3) with the anti-HClpP antibodies and immunogold

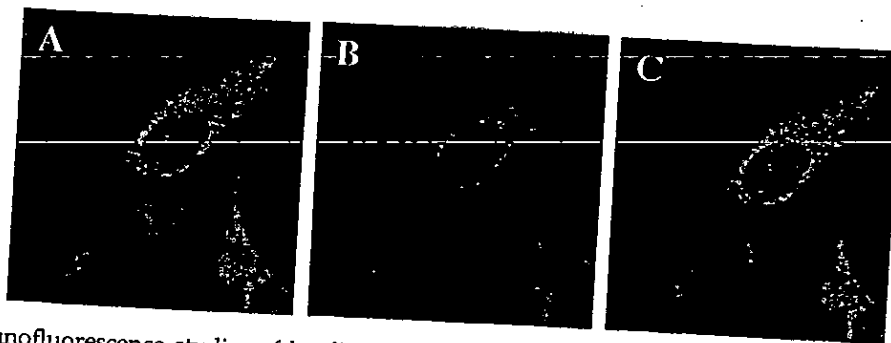


Figure 2. Immunofluorescence studies of localization of ClpP in NRK cells. (a) Anti-HClpP antibody (green fluorescence); (b) Mitotrack staining (red fluorescence); (c) a merge of the corresponding two previous images. Original magnification, 630 x.

staining, demonstrating that the rat ClpP is located in the mitochondrial matrix. Simple inspection of the electron micrographs shows that the gold labelling has a tendency to be associated with the inner mitochondrial membrane, so we performed a quantitative analysis; the data are summarized in Table 1. Immunogold staining of carbamyl phosphate synthetase, an abundant mitochondrial matrix protein, was used as a control (see also Table 1). From the data obtained, the tendency for association of HClpP with inner mitochondrial membrane seems clear (% gold particles/% volume = $34.8/28.1 > 1$, compared to carbamylphosphate synthetase where that quotient is $21.2/28.1 < 1$).

Characterization of oligomeric structure of mitClpP

Once the actual molecular mass of the mitochondrial ClpP subunit was known, we made two more protein constructs, HClpP and NpHClpP. The HClpP construct, encoding the full-length cDNA, gave a major 35 kDa and a minor 32 kDa polypeptide after its expression in bacteria (Figure 4). The abundance of the 32 kDa species increased with the time of induction of BL21 cells (data not shown), indicating a possible ("aberrant") protein processing in bacteria. Both of these polypeptides were higher in relative mass to the mitClpP (see Figure 1). We then made a NH₂-truncated version of HClpP, the NpHClpP construct, that deleted the first 58 amino acid residues of the full-length HClpP (Figure 4(a)). The NpHClpP protein purified to homogeneity was loaded alone or together with the partially purified mitClpP on SDS-gels and analyzed by Western immunoblotting. As shown in Figure 4, both proteins have identical mobility on SDS-PAGE, with an estimated molecular mass of 26 kDa. Furthermore, they behave similarly in two-dimensional analysis (data not shown).

Gel-filtration experiments with both the partially purified mitClpP and the recombinant NpHClpP, demonstrate that they have similar elution profile (Figure 5(a) and (b)) and a calculated native molecular mass of 340 kDa (Figure 5(c)).

This purified recombinant protein was used to analyze its structure by electron microscopy (Figure 6(a)). The projection image of NpHClpP appears as a ring-shaped particle with an outer diameter of 121 Å (corresponding to the en face view). Images obtained from different micrographs



Figure 3. Immunoelectron microscopy of mitClpP. Immunolabelling was performed with the anti-HClpP antibody as described in Material and Methods.

(Figure 6(b)) were used to produce an average projection from 219 particles. The averaged projection (Figure 6(c)) shows a central stain-penetrated region, surrounded by seven similar-staining excluding units. Rotational analysis reveals the presence of a clear 7-fold symmetry (Figure 6(d)). No side projection was identified in the electron microscopic analysis of the different preparations. Taking into account its native M_r of 340,000 as determined by gel filtration, the NpHClpP must consist of two rings of seven subunits stacked along the axis of symmetry.

Discussion

The results presented confirmed previous studies (Corydon *et al.*, 1998) demonstrating that the transfected and overexpressed human homologue of *E. coli* ClpP localizes to the mitochondria. We have extended those results, demonstrating that the endogenous mammalian ClpP localizes in the mitochondria (subcellular fractionation and immunofluorescence studies) and is located in the mitochondrial matrix with a tendency to associate with the inner mitochondrial membrane (electron microscopic studies).

The *E. coli* ClpP is synthesized as a proprotein that is autocatalytically processed to yield the mature form (Katayama *et al.*, 1988). The HClpP has a typical mitochondrial transit peptide in its NH₂ terminus. Corydon *et al.* (1998) have shown

Table 1. Distribution of gold particles and density of labelling in the matrix and inner membrane of rat liver mitochondria immunolabelled with anti-HClpP-specific antibodies followed by immunogold

Mitochondrial compartment	Labelling density ^a	V_v (%) ^b	% of gold particles
Matrix	23.0	71.9	65.2
Inner membrane	31.4	28.1	34.8

^a Carbamylphosphate synthetase immunogold labelling gave a density of 145 gold particles/ μm^2 and a distribution of 78.7% matrix-associated and 21.3% associated to inner membrane, with identical V_v .

^b Labelling densities are expressed as gold particles per μm^2 compartment area. Labelling from controls (0.6 gold particles per μm^2) were subtracted from the experimental values.

^c Volume density: percentage of the total area occupied by the two mitochondrial compartments.

A

HClpP Constructs

HClpP

1 MWPGILVGGARVASCrypALGPRLAAHFPAQRPPQRTLQNGLALQRCLHA TATRALPLIP
NpHClpP 1 MLIP

61 IVVEQTGRGERAYDIYSRLLRERIVCVMGPIDDSVASLVIAQLLFLQSESNNK -113
IVVEQTGRGERAYDIYSRLLRERIVCVMGPIDDSVASLVIAQLLFLQSESNNK
R1HClpP 1 MARSESNNK

B

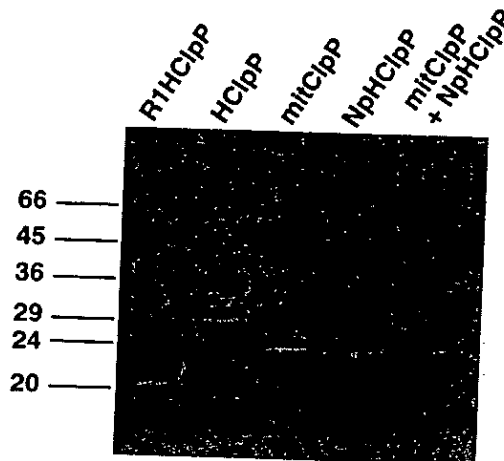
Purified recombinant
and mitochondrial proteinsImmunoblot with α -HClpP

Figure 4. Immunoblot analysis with anti-HClpP antibodies of recombinant HClpP constructs and purified rat mitochondrial ClpP. (a) Scheme showing the different HClpP constructs used. (b) Immunoblot analysis with anti-HClpP of purified recombinant proteins and purified rat liver mitClpP, as indicated.

that the 37 kDa precursor form is imported and converted to a 32 kDa mature form; this form then co-migrates with a recombinant HClpP construct in which the first 56 amino acid residues have been truncated. The results presented here are in partial agreement with those mentioned above. The full-length HClpP cDNA produced a protein with an M_r of 36 kDa when expressed in bacteria (similar mobility was obtained with the product of *in vitro* transcription/translation of the full-length HClpP); this difference is not substantial. The main difference is associated with the M_r of the mature form. We observed a 26 kDa polypeptide, and they report a 32 kDa polypeptide only observed in cells after transfection of the HClpP cDNA (Corydon *et al.*, 1998). In support of the 26 kDa being proposed as the mature species of the mitClpP, we have shown that direct immunoblotting of liver subcellular fractions and immunoprecipitation with our anti-HClpP antibody gave the same polypeptide of 26 kDa. In contrast Corydon *et al.* (1998) did not show the endogenous mitClpP either in Chang or COS-7 cells without transfection of the HClpP cDNA, and they comment that the efficiency of processing in COS-7 cells was rather poor. Furthermore, we partially purified the rat mitochondrial ClpP and found that has the same native M_r (340 kDa) as the recombinant truncated version of HClpP (NpHClpP, missing the first 58

amino acid residues) and identical subunit composition, a single polypeptide of 26 kDa. A perplexing result, already reported (Corydon *et al.*, 1998), was the lack of peptidase activity of both the partially purified mitClpP and the NpHClpP against synthetic peptides known to be substrates of *E. coli* ClpP, including N-Suc-LY-MCA, N-Suc-IW-MCA, N-Suc-LLVY-MCA, N-Suc-AAF-MCA, N-Cbz-GGL- β NA, FPAM-4MNA (Arribas & Castaño, 1993). Furthermore, our trials to find a putative ClpA/X homologue in mitochondria, that activates the putative peptidase or caseinolytic activities of purified mitClpP in an ATP-dependent fashion, have been unsuccessful. Nevertheless, the oligomeric structure of the NpHClpP construct, as deduced from the electron microscopic studies and from its native M_r (identical with the partially purified mitClpP), has shown that it is made of two rings each composed of seven subunits, like the *E. coli* ClpP (Wang *et al.*, 1997, 1998). The accumulation of stain in the center of the particle (Figure 6) dismisses the possibility that we obtained an inactive precursor, because it has been shown that an *E. coli* ClpP SA mutant that preserves uncleaved its N-terminal extension of 14 residues shows a 7-fold symmetry but lacks the central staining (Kessel *et al.*, 1995). Further experiments are clearly needed to establish the function of mammalian mitochondrial ClpP.

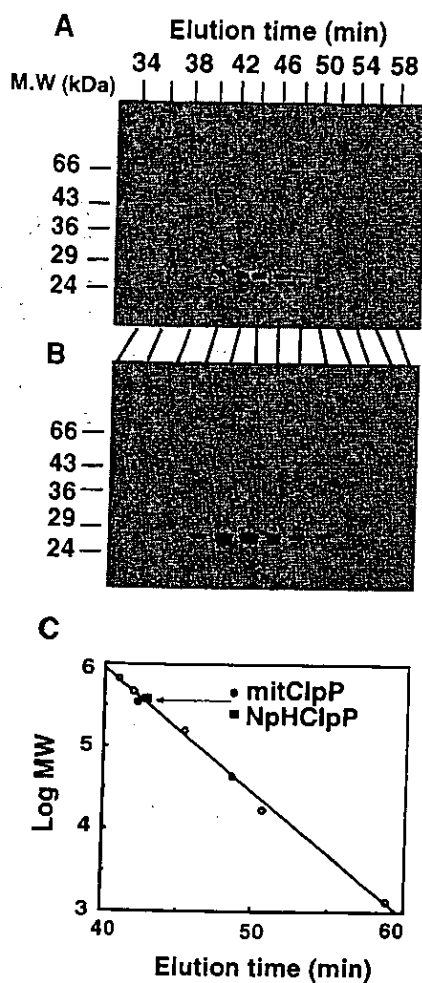


Figure 5. Gel-filtration analysis of purified rat liver mitochondrial ClpP and recombinant NpHClpP. (a) Purified rat liver mitClpP detected by an immunoblot of an SDS-PAGE of the corresponding fractions. (b) Purified recombinant NpHClpP, detected by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. (c) Log plot representation used for calculation of native molecular mass (open symbols, molecular mass markers; filled symbols mitClpP and NpHClpP, as indicated).

Materials and Methods

Cloning, expression constructs of HClpP and purification of HClpP from *E. coli*

Based on human EST sequences similar to *E. coli* ClpP and *C. elegans* ClpP we designed the following oligos: 5' oligo, 5'-GGCGGAATTCCGCTCCGAGACCAACAA-GAAGCCCATCCACATG-3'; 3'-oligo, 5'-GCAGTC-GACTCAGGTGCTAG CTGGGACAGGTTCTGCTG-CCGG-3' and used them with a human placental cDNA library to clone a truncated version of HClpP by PCR amplification. The construct was subcloned into the *EcoRI/SalI* sites of pT7-7 vector for expression (Arribas & Castaño, 1993). This short version, pTR1HClpP, when expressed in BL-21 cells was insoluble. Once the full-length cDNA for HClpP had been published (Bross *et al.*, 1995), we used the following oligos: 5'-oligo, 5'-AGCT-CATATGTGGCCCGGAATATTGGTAGG GGGG and

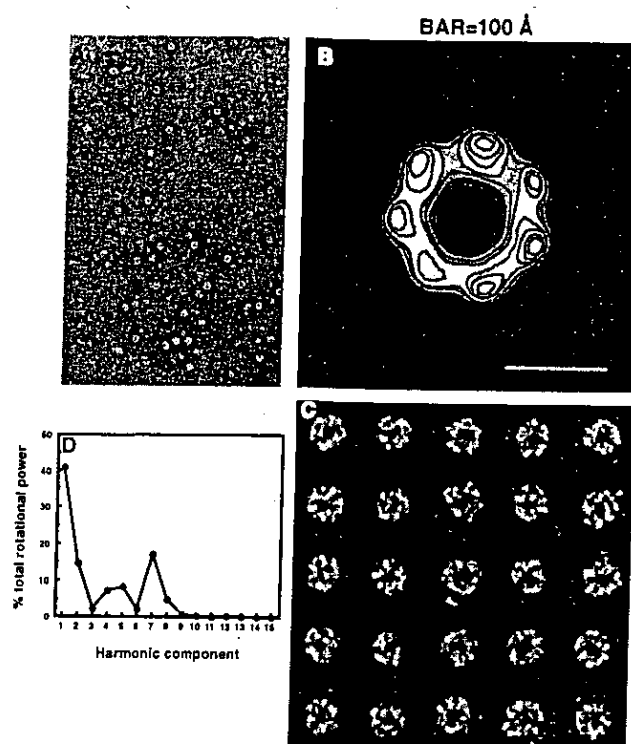


Figure 6. Electron micrographs of HClpP. (a) A typical field of NpHClpP showing the characteristic donut-shaped particle. (b) Gallery of different molecular images used for rotational analysis. (c) Average en face image of NpHClpP based on analysis of 219 individual images. (d) Rotational analysis of the average HClpP image. Abscissae represents the harmonic components, while the ordinate axis shows the percentage of the total rotational power spectrum of the particle.

the same 3'-oligo as above to clone and express the full-length HClpP cDNA, by subcloning the amplified fragment into the *NdeI/SalI* sites of pT7-7 vector. This full-length construct (pTHClpP) when expressed in BL-21 cells was also insoluble. For the *E. coli* ClpP and HClpP sequences, we made an NH₂-truncated construct using the following oligos: 5'-oligo, 5'-GCAGCCATATGCT-CATTCCCATCGTGGTGGAGC and the same 3'-oligo as above, and again subcloned into the *NdeI/SalI* sites of pT7-7 vector. This construct (pTNpHClpP) when expressed in BL-21 produces a soluble protein. All constructs were verified by automated DNA sequence.

The recombinant NpHClpP protein was purified from the corresponding induced bacterial culture containing the pTNpHClpP plasmid, essentially as described for the *E. coli* ClpP (Arribas & Castaño, 1993). Gel-filtration experiments were performed on an HPLC TSK5000 column equilibrated in 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 0.3 M KCl, as described (Arribas & Castaño, 1993).

Subcellular fractionation and purification of mitochondrial rat ClpP

Rat and human liver (obtained from autopsy specimen at Hospital La Paz, Madrid) subcellular fractions were obtained as described (Arizti *et al.*, 1993). Antibodies against protein disulfide isomerase (Nieto *et al.*, 1990), a protein of the endoplasmic reticulum lumen, and sera

from patients with primary biliary cirrhosis that recognized the E1 and E2 components of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex, were used as controls for the immunoblots of liver subcellular fractions. For the purification of rat mitochondrial ClpP (all procedures were conducted at 4°C), ten rat livers (100 g) were homogenized (1/4, w/v) in 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 0.3 M sucrose. The total homogenate was centrifuged at 3000 g for ten minutes, and the supernatant centrifuged at 10,000 g for 15 minutes. The pellet was washed once with homogenization buffer and recentrifuged at 10,000 g for ten minutes. The mitochondrial pellet obtained was homogenized by sonication (ten cycles: ten seconds on, 30 seconds off at maximum output) in 50 ml of buffer A (50 mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.2 M KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT) and centrifuged at 100,000 g for 60 minutes. The clear supernatant was diluted threefold with above buffer without KCl, and applied to a 50 ml DEAE-Cellulose column (Whatman) equilibrated in buffer A containing 50 mM KCl. After washing, proteins were eluted with a linear gradient up to 0.6 M KCl in buffer A. Fractions containing the ratClpP polypeptide (peak elution at 0.3 M KCl) were pooled and applied to a 20 ml hydroxyapatite-column (Bio-Rad) equilibrated with 10 mM KPi (pH 6.8). Protein was eluted with a phosphate gradient to 0.4 M KPi. Fractions containing the rat ClpP were diluted with buffer A (no salt) and loaded onto a 5 ml DEAE-column equilibrated in buffer A (50 mM KCl) for concentration, elution was by a step of buffer A containing 0.3 M KCl. The concentrated fractions were used for the gel filtration experiments and activity determination. In all purification steps, the presence of the rat mitochondrial ClpP was followed by immunoblots of the corresponding fractions.

Affinity purification of antibodies against the HClpP and immunoprecipitation procedures

Rabbit polyclonal antibodies against HClpP were obtained by injection into rabbits of the purified insoluble recombinant pTRIHCIP protein construct, essentially as described (Arribas *et al.*, 1994). The rabbit antisera against HClpP were affinity-purified essentially as described (Arribas *et al.*, 1991). Immunoprecipitations were performed with anti-HClpP antibodies previously coupled to protein A-Sepharose (Sigma) as described (Castaño *et al.*, 1996). The proteins retained on the protein A-Sepharose beads were eluted in SDS sample buffer containing 100 mM N-ethyl-maleimide and no β -mercaptoethanol (to prevent IgG dissociation) by boiling and analyzed by SDS-PAGE. After electrophoresis the gels were used for transfer and immunoblotting as described below.

Protein analysis by SDS-PAGE and immunoblotting

Proteins were analyzed (except where indicated) on SDS-14% PAGE. After electrophoresis the gels were either stained with Coomassie blue or transferred to nitrocellulose, as described (Arribas *et al.*, 1994). Nitrocellulose filters were processed for immunoblot analysis using rabbit anti-HClpP antisera at 1/200-1/500 dilution, as described (Arribas *et al.*, 1994). The blots were developed with alkaline phosphatase labelled goat anti-rabbit antibodies (BioRad) at 1/1000 as described (Arribas *et al.*, 1994).

Immunofluorescence and electron microscopic studies

NRK (rat) and HeLa (human) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum and grown on coverslips to 70% confluency. Cells were incubated with Mitotrack (Molecular Probes, as indicated by the manufacturer), prior to fixation with 4% (v/v) paraformaldehyde in phosphate-buffered saline and permeabilized with TBS (50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 0.15 M NaCl), 0.1% (v/v) Triton X-100 and 3% (w/v) bovine serum albumin for 30 minutes. Cells were stained with affinity-purified anti-HClpP 1/10 for three hours at room temperature. After extensive washing with TBS, the secondary antibody, a fluorescein-conjugated goat anti-rabbit antibody (Boehringer) at 1/300 was added and incubation continued for one hour at room temperature, washed extensively in TBS and mounted on a slide. Laser confocal fluorescence microscopy was performed with a Leica TCS 4D (Germany) confocal microscope and images processed using Adobe Photoshop software. Controls, with preimmune rabbit sera or the secondary antibody alone, were negative. For electron microscopy, mitochondrial fraction of rat liver was fixed and the ClpP was localized by immunogold staining technique using affinity-purified anti-HClpP antibodies, as described (Palmer *et al.*, 1994). Morphometric analysis was performed by determining the area of the various compartments and by counting the associated gold particles. For each measurement, over 20 different electron micrographs, representing 120 randomly selected mitochondria, were analyzed. Micrographs were taken at random (cell areas located in the upper right corner of the supporting nickel grids) from three different grids. The lateral resolution of the procedure was calculated to be 21 nm. Thus, a line was drawn on the electron micrographs following the inner membrane of the cells with a thickness corresponding to 42 nm (2 nm \times 21 nm). This established an inner mitochondrial membrane-associated area and the matrix area was defined as the cell area bordered by the inner membrane area. For all these compartments, the number of gold particles were counted on each cell area and areas were determined by the point-counting method using a multipurpose test system (18 cm \times 24 cm) containing 154 test points. Gold labelling densities are expressed as number of gold particles/ μm^2 of each mitochondrial compartment.

Electron microscopy of purified HClpP

Gel-filtration purified NpHCIP was negatively stained with 2% uranyl acetate on thin carbon-collodion grids. Micrographs were taken in a Jeol 1200 EX II microscope at a nominal magnification of 60,000 \times . Images were digitized at 0.4 nm/pixel and the characteristic front views were centered and aligned using a free-pattern algorithm (Penczek *et al.*, 1992; Marco *et al.*, 1996). Average images from 219 particles were calculated and filtered to the resolution obtained (2 nm), as estimated by the signal-to-noise ratio method (Unser *et al.*, 1987).

Acknowledgments

We thank Dr Erwin Knecht from Instituto de Investigaciones Citológicas de Valencia for performing the mitochondrial electron microscopic studies. We also thank Concepción Bailón, Instituto Cajal de Madrid, for help

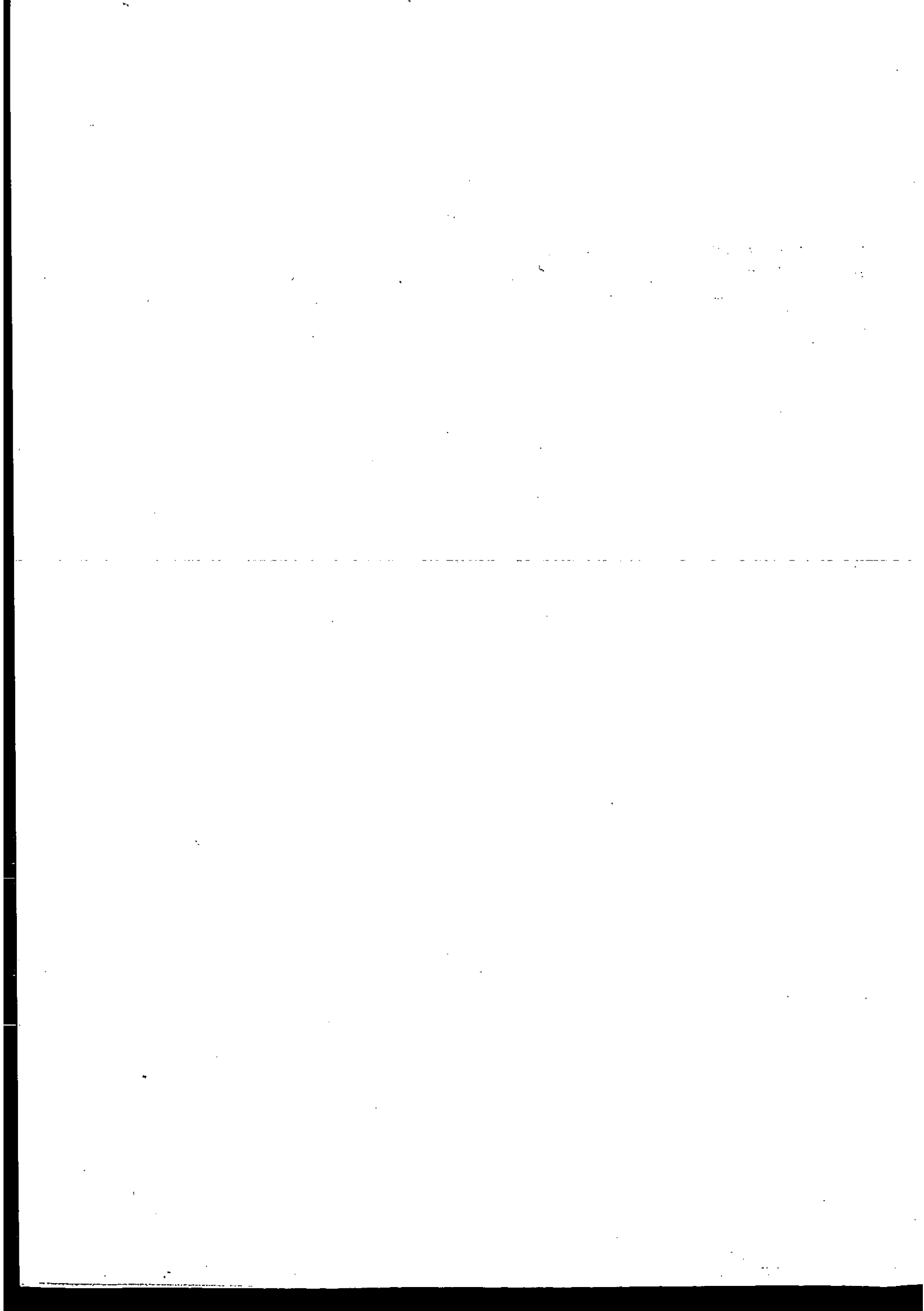
with the confocal microscope; and Carmina Gutiérrez for help in handling the animals used for antibody production. This work was supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF96-0049 and SAF99-0056), Fundación Ramón Areces, Fundación La Caixa and CAM. I.M. is a recipient of a pre-doctoral fellowship from Fundación la Caixa. S.R.-V. is recipient of a pre-doctoral fellowship from Ministerio de Educación y Cultura.

References

- Arizti, P., Arribas, J. & Castaño, J. G. (1993). Modulation of the multicatalytic proteinase complex by lipids, interconversion and proteolytic processing. *Enzyme Protein*, **47**, 285-295.
- Arribas, J. & Castaño, J. G. (1993). A comparative study of the chymotrypsin-like activity of the rat liver multicatalytic proteinase and the ClpP from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**, 21165-21171.
- Arribas, J., Luz-Rodríguez, M., Alvarez-Do-Forno, R. & Castaño, J. G. (1991). Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **173**, 423-427.
- Arribas, J., Arizti, P. & Castaño, J. G. (1994). Antibodies against the C2 COOH-terminal region discriminate the active and latent forms of the multicatalytic proteinase complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 12858-12864.
- Bross, P., Andresen, B. S., Knudsen, L., Kruse, T. A. & Gregersen, N. (1995). Human ClpP protease: CDNA sequence, tissue-specific expression and chromosomal assignment of the gene. *FEBS Letters*, **377**, 249-252.
- Castaño, J. G., Mahillo, E., Arizti, P. & Arribas, J. (1996). Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry*, **35**, 3782-3789.
- Clarke, A. K., Gustafsson, P. & Lidholm, J. A. (1994). Identification and expression of the chloroplast ClpP gene in the conifer *Pinus contorta*. *Plant. Mol. Biol.* **26**, 851-862.
- Corydon, T. J., Bross, P., Holst, H. U., Neve, S., Kristiansen, K., Gregersen, N. & Bolund, L. (1998). A human homologue of *Escherichia coli* ClpP caseinolytic protease: recombinant expression, intracellular processing and subcellular localization. *Biochem. J.* **331**, 309-316.
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 465-506.
- Gottesman, S., Clark, W. P., de-Crecy-Lagard, V. & Maurizi, M. R. (1993). ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* activities. *J. Biol. Chem.* **268**, 22618-22626.
- Gottesman, S., Maurizi, M. R. & Wickner, S. (1997a). Regulatory subunits of energy-dependent proteases. *Cell*, **91**, 435-438.
- Gottesman, S., Wickner, S. & Maurizi, M. R. (1997b). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* **11**, 815-823.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. & Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12**, 1338-1347.
- Katayama, Y., Gottesman, S., Pumphrey, J., Rudikoff, S., Clark, W. P. & Maurizi, M. R. (1988). The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Purification, cloning, and mutational analysis of the ATP-binding component. *J. Biol. Chem.* **263**, 15226-15236.
- Kessel, M., Maurizi, M. R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B. L., Singh, S. K. & Steven, A. C. (1995). Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J. Mol. Biol.* **250**, 587-594.
- Larsen, C. N. & Finley, D. (1997). Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell*, **91**, 431-434.
- Marco, S., Chagoyen, M., de la Fraga, L. G., Carazo, J. M. & Carrascosa, J. L. (1996). A variant of the "random approximation" of the reference-free alignment algorithm. *Ultramicroscopy*, **66**, 5-10.
- Maurizi, M. R., Clark, W. P., Kim, S. H. & Gottesman, S. (1990). ClpP represents a unique family of serine proteases. *J. Biol. Chem.* **265**, 12546-12552.
- Nieto, A., Mira, E. & Castaño, J. G. (1990). Transcriptional regulation of rat liver protein disulphide-isomerase gene by insulin and in diabetes. *Biochem. J.* **267**, 317-323.
- Palmer, A., Mason, G. G., Paramio, J. M., Knecht, E. & Rivett, A. J. (1994). Changes in proteasome localization during the cell cycle. *Eur. J. Cell Biol.* **64**, 163-175.
- Penczek, P., Radermacher, M. & Frank, J. (1992). Three-dimensional reconstruction of particles embedded in ice. *Ultramicroscopy*, **40**, 33-52.
- Shanklin, J., DeWitt, N. D. & Flanagan, J. M. (1995). The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant. Cell*, **7**, 1713-1722.
- Thompson, M. W. & Maurizi, M. R. (1994). Activity and specificity of *Escherichia coli* ClpAP protease in cleaving model peptide substrates. *J. Biol. Chem.* **269**, 18201-18208.
- Thompson, M. W., Singh, S. K. & Maurizi, M. R. (1994). Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*. Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **269**, 18209-18215.
- Unser, M., Trus, B. L. & Steven, A. (1987). A new resolution criterion based on the spectral signal-to-noise method ratios. *Ultramicroscopy*, **23**, 39-52.
- Wang, J., Hartling, J. A. & Flanagan, J. M. (1997). The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell*, **91**, 447-456.
- Wang, J., Hartling, J. A. & Flanagan, J. M. (1998). Crystal structure determination of *Escherichia coli* ClpP starting from an EM-derived mask. *J. Struct. Biol.* **124**, 151-163.
- Wawrzynow, A., Wojtkowiak, D., Marszałek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, B., Georgopoulos, C. & Zylicz, M. (1995). The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J.* **14**, 1867-1877.

Edited by W. Baumeister

(Received 8 April 1999; received in revised form 6 August 1999; accepted 10 August 1999)



Antibodies against the COOH-terminal region of *E. coli* ClpP protease in patients with primary biliary cirrhosis

Isabel Mayo^{1*}, Paz Arizti^{1*}, Albert Parés², Joaquín Oliva¹, Rita Alvarez Doforno³,
Maria Rosa de Sagarra¹, Juan Rodés² and José G. Castaño^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, UAM-CSIC, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, ²Liver Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona and ³Servicio de Inmunología Ciudad Sanitaria La Paz, Madrid, Spain

Background/Aims: The presence of antibodies in sera from patients with autoimmune diseases is an important tool for diagnosis and for providing insights into the mechanisms leading to autoimmunity. The aim of this study was to characterize new reactive antigens in liver autoimmune diseases.

Methods: Sera of patients with liver-related autoimmune ($n=74$) and non-liver-related autoimmune ($n=211$) diseases, non-autoimmune liver diseases ($n=18$) and healthy controls ($n=160$) were evaluated for antibodies against *E. coli* ClpP protease (EClpP) and 20S proteasome by immunoblot analysis.

Results: Antibodies against EClpP were detected in 15 of 50 patients with primary biliary cirrhosis, in only one of 100 patients with systemic lupus erythematosus, and in three healthy subjects (Chi-square 59.1, d.f. 2, $p < 0.001$). Antibodies to 20S proteasome were found in only 35 of 100 patients with systemic lupus erythematosus. All other sera from patients with autoimmune diseases, liver diseases other than pri-

mary biliary cirrhosis, and healthy controls were negative for both antigens. Both IgG and IgM classes of antibodies against EClpP were present in primary biliary cirrhosis patient sera with titers of 1/400–1/1000. By using recombinant techniques and peptide ELISA, the immunodominant EClpP epitope recognized by the sera from primary biliary cirrhosis patients was localized in the amino acid sequences 177–194 (QIERDTERDRFLSAPEAV) within the COOH-terminal of EClpP. Affinity-purification of these anti-EClpP antibodies and immunoabsorption experiments established that the antibodies are specific for the bacterial EClpP.

Conclusions: Bacterial EClpP has been identified as a new antigen specifically reacting with sera from approximately one third of patients with primary biliary cirrhosis.

Key words: Antibodies; Autoimmune; ClpP; Epitope mapping; Primary biliary cirrhosis; Proteasome.

P RIMARY BILIARY CIRRHOSIS (PBC) is a chronic cholestatic liver disease characterized by the presence of progressive inflammatory obliteration of intrahepatic bile ducts and anti-mitochondrial antibodies (AMA) (1). The major antigens recognized by those autoantibodies have been identified as the E2 components of pyruvate dehydrogenase (PDC), 2-oxoglutarate de-

hydrogenase and branched chain 2-oxo acid dehydrogenases complexes (2,3). Furthermore, it has also been shown that the major autoepitope for CD4 T-cells in PBC patients is within the sequence of the PDC E2 epitope for the autoantibodies (4,5). Apart from AMA, other disease-specific autoantibodies have been described and are directed against proteins localized in the nuclear membrane: gp 210 (6–9), p62 (10) and lamin B receptor (11,12). AMA-negative PBC patients by immunofluorescence (some patients may be AMA-positive by immunoblot) and PBC patients with high titers of antinuclear IgG antibodies, may constitute two other groups of PBC patients (1).

We have used purified recombinant *E. coli* ClpP protease and rat liver proteasome in a survey screening for

* Both authors contributed equally to the work presented.

Received 30 December 1999; revised 14 February; accepted 23 February 2000

Correspondence: José G. Castaño, Departamento de Bioquímica e Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", UAM-CSIC, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. 28029 Madrid, Spain. Fax: 34 91 585 4587. e-mail: joseg.castano@uam.es

new antibodies in liver-related and non-related human autoimmune diseases (13,14). We have found a fairly specific association of anti-EClpP antibodies with PBC. These antibodies are specific for bacterial EClpP and their major epitope has been mapped within the EClpP COOH-terminal sequence: 177-QIERDTERDRFLSAPEAV-194. These findings give additional support to the hypothesis that a bacterial trigger in a predisposed host could be responsible, at least in part, for the autoimmune response observed in PBC patients.

Materials and Methods

Patients and controls

A survey screening for anti-EClpP and anti-proteasome antibodies was performed in sera of patients with several non-liver-related systemic autoimmune diseases ($n=211$), and liver-related autoimmune diseases, including patients with PBC ($n=50$), primary sclerosing cholangitis ($n=14$), and autoimmune hepatitis ($n=10$). Sera from 100 healthy subjects, and from 18 patients with alcoholic cirrhosis or obstructive cholestasis secondary to choledocholithiasis were used as controls (Table 1). A further group of healthy subjects ranging in ages between 67 and 85 years old were used as controls. The healthy subjects had no clinical history of allergy or autoimmune disease, and they did not have any clinical feature of bacterial or viral infection when evaluated. All control subjects were ANA and AMA negative by indirect immuno-fluorescence (IIF) on HepG2 cells. The current investigation was approved by the Ethical Committees of the two participating hospitals and informed consent was obtained from all subjects.

Protein purification and affinity-purification of antibodies

Purified rat liver proteasome complex was obtained as described (13,15). The recombinant EClpP protease was purified from BL21 cells harboring the pTC1pP plasmid as described (14). Total bacterial cell extracts from non-induced and induced (0.5 mM IPTG for 1 h)

TABLE 1

Anti-EClpP and anti-proteasome antibodies in sera of patients and healthy subjects

	No. of sera tested	Anti-EClpP positive by immunoblot	Anti-proteasome positive by immunoblot
Systemic lupus erythematosus	100	1	35
Rheumatoid arthritis	50	0	0
Vasculitis	20	0	0
Dermatomyositis	4	0	0
Polymyositis	6	0	0
Scleroderma	6	0	0
Autoimmune thyroid diseases	25	0	0
Primary biliary cirrhosis	50	15	0
Primary sclerosing cholangitis	14	0	0
Autoimmune hepatitis	10	0	0
Alcoholic cirrhosis	8	0	0
Obstructive choledocholithiasis	10	0	0
Healthy subjects	100	0	0
Aged healthy subjects	60	3	0

BL-21 cells carrying the pTC1pP plasmid were obtained by direct resuspension of bacterial pellets in SDS-sample buffer and boiling. Purified recombinant human ClpP protein (protein constructs RHClpP, full-length HClpP and NpHClpP) was obtained as described (16). Rabbit polyclonal antibodies against EClpP have been described (14). The antibodies against EClpP or PDC present in patient sera were affinity-purified as described (13).

Protein analysis and immunoblotting

Proteins were analyzed (except where indicated) on 16% SDS-PAGE and then they were either stained with Coomassie Blue or transferred to nitrocellulose (BA85, Schleicher and Schuell), as described (13,15). Nitrocellulose filters were reversibly stained with 0.1% Ponceau red in 1% acetic acid and blocked overnight at 4°C with blocking buffer: TTBS (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20) with 5% (w/v) defatted dry milk or 3% BSA for immunoblot analysis. The filters were routinely incubated with rabbit anti-EClpP antisera (1/400) or sera from human subjects at 1/100 dilution for 3 h at room temperature. The blots were developed with alkaline phosphatase labeled goat anti-rabbit or anti-human antibodies (BioRad, Sigma) at 1/1000, as described (15). The Ig isotype was defined by immunoblot with alkaline-phosphatase labeled antibodies against human IgA, IgM and IgG (Sigma) at 1/4000 dilution. Serum pre-absorption was done by incubation (2 h at room temperature) of the diluted sera (1/400) with an excess of EClpP (1 µg/ml), porcine PDC (2 µg/ml) or HClpP (2 µg/ml) and then directly used for immunoblotting against EClpP.

Porcine pyruvate dehydrogenase (Sigma) used in some experiments was run on 14% SDS-PAGE, stained with Coomassie and the protein bands recognized by the antibodies from parallel blots, excised, fully digested with trypsin and subjected to mass spectrometric analysis, as described (17). Data obtained by matrix-assisted laser-desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) were analyzed for protein identification as described (18).

E. coli ClpP protein constructs for epitope mapping

Direct constructs: Protein constructs derived from the pTC1pP plasmid that contains the ClpP coding sequence in the pT7-7 expression vector were obtained by partial digestion with EcoRV and religation (14). The constructs named: pTC1pPΔ1 and pTC1pPΔ1,2, resulted from the internal in-frame ligation of the EcoRV sites of the ClpP gene as follows: 96 to 216 and 96 to 444, respectively, resulting in the deletion of the corresponding internal DNA fragments. An N-terminal construct (pTC1pPRIN) was obtained by partial digestion of pTC1pP plasmid with EcoR1, filling-in, and religation to obtain a protein construct that ends within the internal EcoR1 site of the ClpP coding sequence (aa 1-130). All the constructs, checked by direct sequencing, were used to transform BL21(DE3) cells for expression and the recombinant proteins were purified from the insoluble inclusion bodies as described (15).

Fusion protein constructs of EClpP: The EcoRV/Sal I fragment (aa 148-207) from pTC1pPΔ1,2 construct was isolated and ligated in frame with pGEX-4T-1 to obtain pGEX-RVC-ClpP, resulting in the production of a fusion protein glutathione transferase followed by the C-terminal portion of the EClpP protein. Protein expression was induced in DH5α cells and the fusion protein purified by affinity-chromatography on glutathione-sepharose as described (19). The EcoRV fragment comprising nucleotide 216 to 444 (Δ2) of the ClpP coding sequence (aa. 74-178) was ligated to the internal EcoRV site of the cDNA encoding for human proteasome C8 subunit construct in the pT7-7 vector (20). Cloning of this fragment in both orientations generated the constructs pTHC8Δ2D and pTHC8Δ2I, respectively and the proteins were purified as described (15).

ELISA assays

Peptides derived from the C-terminal portion of the ClpP were synthesized by Research Genetics Inc and purified by reverse phase HPLC. The peptides: SP 150-164, EIHAEREILKVKGRMN; SP 165-180, ELMALHTGQSLEQIER; SP 177-194, QIERDTERDRFLSAPEAV and SP 188-207, LSAPEAVEYGLVDSILTHRN were dissolved in 0.1

M Na₂CO₃ at 50 µg/ml and 96-well plates (Nunc) were coated overnight with 50 µl of the peptide solution at 4°C. Plates were washed with TTBS and blocked for 3 h at room temperature with 200 µl of blocking buffer (see above). Sera (50 µl) diluted in blocking buffer were added to the wells and incubated for 3 h at room temperature or overnight at 4°C. After washing with TTBS, the secondary peroxidase-labeled antibody (anti-human or anti-rabbit) at 1/1000 dilution was added in blocking buffer and incubated for 1 h at room temperature. After extensive washing, reaction was developed and quantitated in an EL340 (from Biotek) microplate reader at 490 nm. In each experiment, assays were run in triplicate and control wells containing no primary antibody, preimmune sera from rabbit and control human sera were included to subtract background.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± standard deviation of the mean. The Chi-square test was used to analyze differences in non-continuous variables and the Student *t*-test or Mann-Whitney test were used to analyze differences in continuous variables. A two-tailed *p*-value < 0.05 was considered to indicate a significant difference.

TABLE 2

Clinical and analytical data of PBC patients according to seropositivity to EClpP

	Anti-EClpP positive (n=15)	Anti-EClpP negative (n=35)	<i>p</i> -value
Age (years)	63.2 ± 10.3	55.4 ± 6.8	0.003
Sex (M/F)	1/14	2/33	n.s.
Years from first symptom	8.9 ± 5.3	8.4 ± 6.3	n.s.
Years from diagnosis	5.4 ± 4.5	5.5 ± 3.8	n.s.
Hepatomegaly (%)	53	49	n.s.
Splenomegaly (%)	20	20	n.s.
Jaundice (%)	0	17	n.s.
Skin hyperpigmentation (%)	20	31	n.s.
Pruritus (%)	40	57	n.s.
Ascites (%)	0	0	n.s.
UGB (%)	13	3	n.s.
Encephalopathy (%)	0	0	n.s.
Sjögren's syndrome (%)	80	69	n.s.
AST (u/l)	58.1 ± 20.8	91.2 ± 80.1	n.s.
Bilirubin (mg/dl)	1.2 ± 1.3	2.3 ± 3.2	n.s.
Alkaline phosphatase (u/l)	652 ± 324	872 ± 514	n.s.
γ-glutamyl transferase (u/l)	220 ± 142	352 ± 267	n.s.
AMA positive (%)	100	89	n.s.
ANA positive (%)	87	71	n.s.
IgA (mg/dl)	420 ± 180	400 ± 200	n.s.
IgM (mg/dl)	740 ± 400	480 ± 200	0.004
IgG (mg/dl)	2335 ± 970	1940 ± 640	0.09

UGB: upper gastrointestinal bleeding.

TABLE 3

Histological stage of PBC patients according to seropositivity to EClpP

	Anti-EClpP positive (n=15)	Anti-EClpP negative (n=35)
I	3 (20%)	14 (40%)
II	4 (27%)	12 (34%)
V	6 (40%)	6 (17%)
V	2 (13%)	3 (9%)

Chi-square=3.95, degrees of freedom=3; *p*=n.s.

Results

Screening of sera against E. coli ClpP and rat proteasome

Immunoreactivity of purified recombinant EClpP protease (1 µg) and rat liver proteasome (2 µg) was examined by immunoblotting with sera at 1/100 dilution. Thirty-five patients, all of them with systemic lupus erythematosus (SLE), showed antibodies against proteasomes. No reactivity against proteasomes was observed in the remaining patients and controls (Table

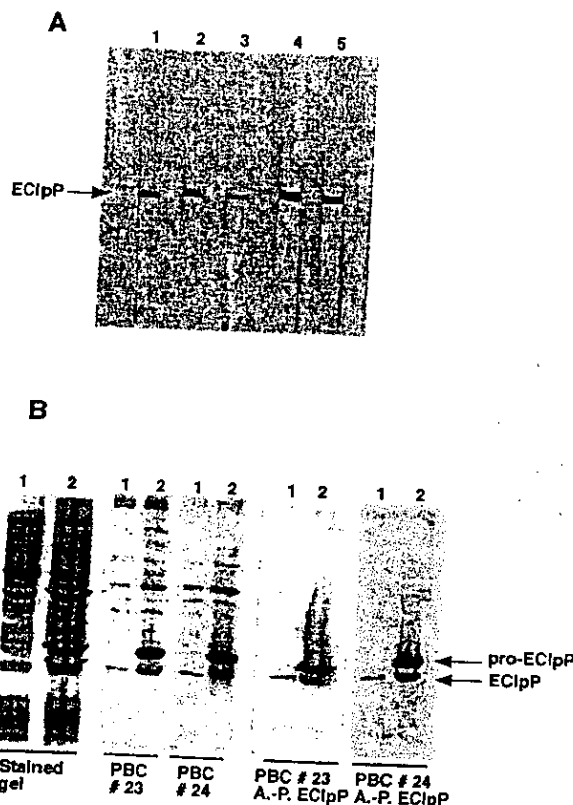


Fig. 1. Representative immunoblot analysis of sera from PBC patients against EClpP. Panel A, purified recombinant EClpP protease was loaded in a continuous 16% SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose and cut into strips. Strips were processed for immunoblot analysis as described under Materials and Methods and probed with: lane 1. Rabbit anti-ClpP serum (used as control) and with human sera from different patients: lane 2, 300A (SLE patient); lanes 3 and 4, PBC patients Nos. 23 and 24 and lane 5, elderly and apparently healthy subject serum No. 2N, respectively. Panel B, total cell extracts from BL-21 E. coli cells harboring the pTClpP plasmid non-induced (lanes 1) or induced (lanes 2) with IPTG were resolved on 14% SDS-PAGE and either stained with Coomassie blue or transferred to nitrocellulose for immunoblotting. Total sera from two PBC patients (Nos. 23 and 24) at 1/200 dilution or affinity-purified anti-EClpP antibodies from the same patients were used. Arrows mark the mobility of the precursor form of EClpP (pro-EClpP) and the mature EClpP (EClpP).

sera were identified as the E2 and E1 α subunits of porcine PDC complex by MALDI-TOF mass spectrometry (data not shown). In contrast, IgG class alone of anti-ECI_P antibodies (titer 1/200–1/400) was detected in the three sera of healthy elderly subjects. However, as mentioned above, the sera of these ECI_P-positive elderly subjects, while AMA-negative by IIF, contained both IgG and IgM classes of anti-PDC antibodies when assessed by immunoblotting (Fig. 2, 2N). None of the remaining 57 elderly and apparently healthy subjects had antibodies to PDC by immunoblotting.

Mapping the ECI_P epitope

In order to study the epitopes to which the anti-ECI_P antibodies were directed, several ECI_P protein constructs were obtained and tested with patient sera and with our rabbit polyclonal anti-ECI_P antiserum. The results are summarized by the data presented in Fig. 3; similar results were obtained with 10 different PBC patient sera. Based on the results obtained, we conclude that the main epitope of the ECI_P recognized by human antibodies (from PBC patients or elderly subjects) is located in the COOH-terminal portion of the ECI_P protein, more precisely within the last 50 aminoacids of the protein (EIHAREILKVK GRM-NELMALH TGQSLEQIER DTERDRFLSA PEAVEYGLVD SILTHR_N). Fig. 3F shows that the rabbit anti-ECI_P antibodies also reacts with the pTHC8A2D protein construct (aa 74–148) that is not recognized by the human sera. The rabbit antiserum does not recognize the protein construct pTHC8A2I, where the A2 ECI_PPDNA fragment was cloned in the opposite orientation (data not shown). These results indicate that the antibody repertoire obtained in rabbits is not as restricted as the one observed with the human positive sera.

To further define the reactive sequence within the C-terminal portion of the ECI_P, a series of synthetic peptides (SP) encompassing this region was prepared, as detailed under Materials and Methods. SP 150–164 (EIHAREILKVKGRMN) and SP 188–207 (LSA-PEAVEYGLVDSILTHR_N) were negative by ELISA with either the rabbit anti-ECI_P antiserum or the human ECI_P-positive sera. SP 177–194 (QIERDTERDRFLSAPEAV) was clearly recognized by both the rabbit and the ECI_P-positive human sera. SP 165–180 (ELMALHTGQSLEQIER) was also recognized, but to a much lesser extent than SP 177–194. A titration curve with both positive peptides is presented in Fig. 4 for the rabbit and for sera of one of the PBC patients. Similar results were obtained with 10 different PBC patient sera and with the ECI_P-positive (apparently

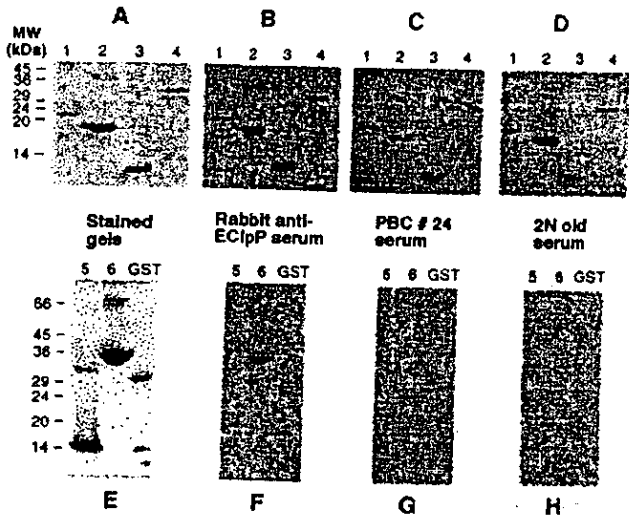
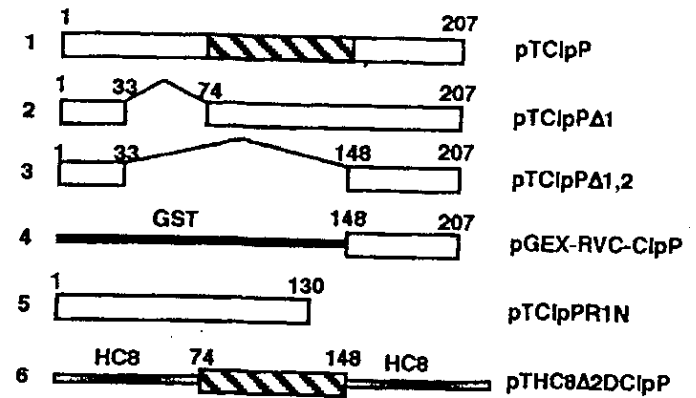


Fig. 3. Epitope mapping of anti-ECI_P antibodies by immunoblot of different ECI_P protein constructs. The upper part of the figure shows a schematic drawing of the different protein constructs (aminoacid numbers refers to full-length ECI_P protein) used for epitope mapping, numbered from 1 to 6 (see Materials and Methods for details). Panel A, shows an 18% SDS/PAGE gel stained with Coomassie blue of the purified recombinant proteins 1 to 4. Panels B, C and D show immunoblots of similar gels probed with sera from rabbit anti-ECI_P, PBC patient No. 24, and 2N, an elderly and apparently healthy subject who was seropositive to ECI_P, respectively. E, shows an 18% SDS/PAGE gel stained with Coomassie blue of the purified recombinant proteins 5, 6 and glutathione transferase (GST). F, G, and H show immunoblots of similar gels probed with the same sera shown above.

healthy) elderly subjects. Preimmune serum from rabbit or control human sera were negative against the four SP by ELISA (data not shown). These results permit the conclusion to be drawn that the main epitope recognized by human antibodies maps to the sequence 177-QIERDTERDRFLSAPEAV-194 of the COOH-terminal of ECI_P.

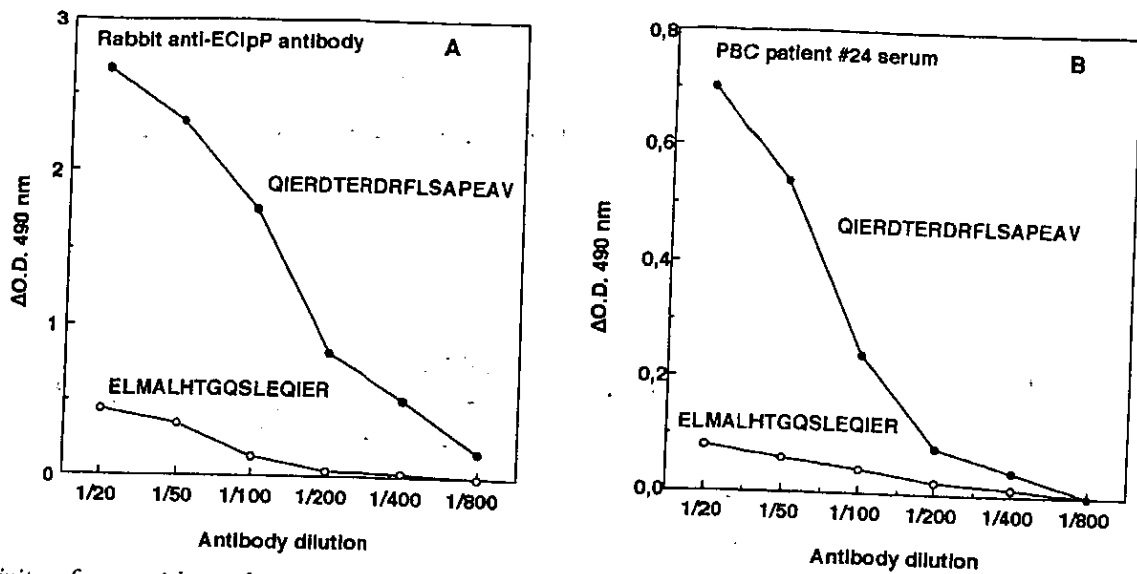


Fig. 4. Reactivity of sera with synthetic peptides of the COOH-terminal of EClpP, as determined by ELISA. Ninety-six-well microtiter plates were coated with the indicated peptide and processed for ELISA, as described under Materials and Methods, using either the rabbit anti-EClpP serum (Panel A) or PBC patient serum No. 24 (Panel B). Each point represents the average from three determinations with deviations less than 2%.

Specificity of PBC sera for EClpP protein

The detection of anti-EClpP antibodies in PBC patients, a protein not present in the mammalian cell, may indicate that other mammalian proteins could be the autoantigen to which those antibodies are directed. The existence of a mammalian mitochondrial homologue of the EClpP (15,20), prompted us to investigate the HClpP protein as a possible candidate. The results presented in Fig. 5 clearly show that the sera from PBC patients (shown only for one patient, but identical results were obtained with each EClpP-positive PBC patient serum) failed to recognize the recombinant R1HClpP protein construct (identical results were obtained with the full-length HClpP and the NpHClpP protein constructs). The sera from elderly subjects reactive with EClpP also failed to recognize the R1HClpP protein (Fig. 5). In contrast, the rabbit anti-EClpP antiserum recognized the recombinant EClpP protein and also R1HClpP, though to a much lesser extent. Furthermore, direct screening of the PBC patients and sera from healthy old subjects with R1HClpP, showed that only two of the PBC patient sera contained low-titer (1/20) antibodies against HClpP and none of them immunoprecipitated the native HClpP protein (construct NpHClpP). Furthermore, we could not detect by immunoblot against rat or human liver any specific polypeptide recognized by the affinity-purified anti-EClpP antibodies obtained from EClpP-positive PBC patient sera. As a consequence, we investigated if the reactivity to EClpP could be specifically removed upon absorption with purified

recombinant EClpP. To this end, representative sera from PBC patients were diluted 1/400 and incubated for 2 h at room temperature with an excess of EClpP (1 μ g/ml). After absorption, these sera were probed

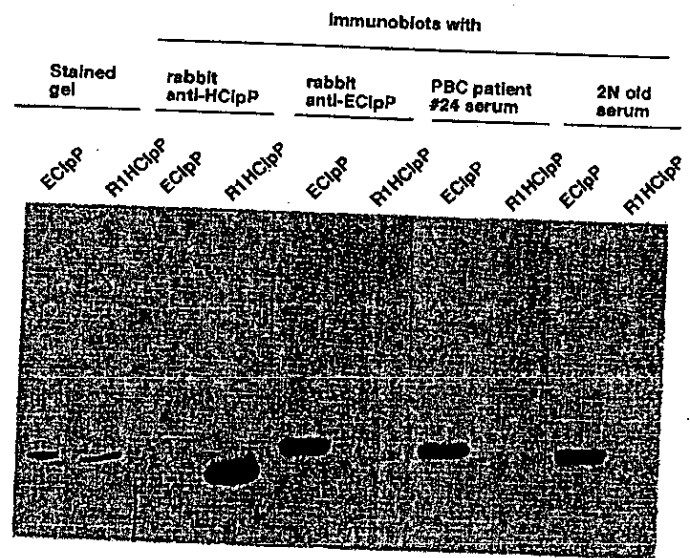


Fig. 5. Human ClpP protein is not recognized by anti-EClpP antibodies present in human sera. Purified recombinant EClpP and R1HClpP were resolved by 14% SDS-PAGE and either stained with Coomassie blue or transferred to nitrocellulose for immunoblot analysis. Immunoblots were performed with the sera indicated at the top. Note that PBC patient serum No. 24 and EClpP-positive serum from an elderly healthy subject No. 2N only recognizes the EClpP.

Total serum dilution 1/400

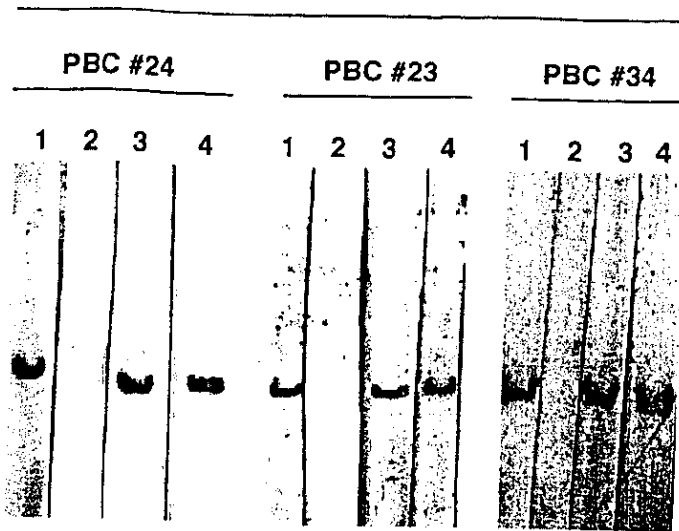


Fig. 6. Specificity of PBC sera for EClpP protein. Western blot analysis with EClpP of PBC patient sera diluted 1/400 and used either directly (lanes 1) or pre-absorbed with: an excess of EClpP (lanes 2), excess of porcine PDC (lanes 3), and excess of HClpP (lanes 4). The results of three representative EClpP-positive PBC patients are shown.

against EClpP by routine Western blot analysis. Results showed that pre-absorption of these sera with EClpP removed all reactivity to EClpP (Fig. 6, lanes 2). In contrast, pre-absorption with excess porcine PDC (2 $\mu\text{g/ml}$) or HClpP (2 $\mu\text{g/ml}$) did not remove reactivity to EClpP (Fig. 6, lanes 3 and 4, respectively). Furthermore, antibodies affinity-purified from these sera on porcine PDC E2 and E1 α failed to react with EClpP (data not shown).

Discussion

A serological response to the 2-oxo-acid-dehydrogenase complexes is highly specific for PBC, found in 90–100% of all PBC patients and rarely in other diseases (1,3). In this study we provide evidence for the presence of circulating antibodies to EClpP in approximately one third of patients with PBC. The prevalence of EClpP seropositivity is similar to that reported for gp210 and p62 nuclear proteins in PBC patients (6,10,21). EClpP reactivity appears disease-specific for PBC, because only 4 of 413 control sera from patients with different autoimmune diseases or healthy subjects showed significant reactivity against EClpP by immunoblot analysis. EClpP-positive PBC patients were significantly older and serum IgM levels significantly higher than in those EClpP-negative PBC. The other clinical, biochemical and immunological parameters were not significantly different between the two PBC groups. All patient sera reactive with EClpP

were also AMA positive by immunofluorescence and by immunoblotting against porcine PDC (Fig. 2). Three sera from the elderly subjects were reactive with EClpP, these sera being AMA-negative by immunofluorescence but positive by immunoblot with E1 α and E2 subunits of PDC (Fig. 2). As a consequence, the association of anti-EClpP with anti-AMA antibodies is also observed in those elderly and apparently healthy subjects. The presence of AMA antibodies in healthy adults has been described. In two reports where AMA antibodies have been studied by ELISA and immunoblotting, a prevalence of 7 of 201 (3.4%) and 9 of 1530 (0.5%) was found, whereas none or just one of the AMA-positive samples were determined to be positive by indirect fluorescence microscopy, respectively (22,23). These results, like those presented here, reflect the higher sensitivity of immunoblotting with recombinant proteins compared with indirect immunofluorescence for the detection of AMA antibodies. Does this reactivity reflect the high sensitivity of the test generating false-positive for a low-prevalence disease? Do these patients represent presymptomatic or extremely mild PBC patients who would never present to a physician? A definitive answer to these question will require further prospective studies of the population.

The epitope within the EClpP recognized by human antibodies has been localized to a linear aminoacid-sequence within the COOH terminal portion of the protein. The epitopes of EClpP recognized by human antibodies are more restricted than those recognized by the sera of rabbits immunized with the EClpP protein. These results suggest a mono- or oligoclonal B-cell activation in PBC patients

The specificity of anti-EClpP antibodies was demonstrated by affinity-purification and absorption of serum samples with recombinant EClpP. These antibodies do not show cross-reactivity to HClpP (the mitochondrial homologue of EClpP) or to any other autoantigen. The patients did not have any previous or actual clinical signs of a relevant bacterial infection. A possible hypothesis to explain these results is that a bacterial challenge in genetically predisposed individuals is part of the pathogenesis of PBC (1,3). In this concern, and despite controversial results (24–27), there are some lines of evidence that implicate a role for infectious agents in the pathogenesis of PBC. Geographical clustering of PBC among relatives has been reported, suggesting the involvement of environmental factors as etiological agents of the disease (28). Also a high prevalence of bacteriuria with a very high recurrence rate in females with PBC, compared to other forms of chronic liver disease, has been described (29). Likewise, mycobacterial infection has also received

attention in the pathogenesis of PBC. Thus, the sera from patients with PBC react with an extract of *Mycobacterium gordonae*, and the antibodies to the *M. gordonae* 65 kDa heat-shock protein cross-react with the mitochondrial autoantigens in PBC (30,31), whereas sera from patients with active pulmonary tuberculosis reacted with the PDC-E2 subunit, also emphasizing the role of mycobacterial infection in PBC (32).

Another equally valid hypothesis would be that an unidentified cellular polypeptide is the antigen and that antibodies against it coincidentally cross-react with bacterial EClpP. All our experiments addressed to demonstrate the existence of such an autoantigen have failed. As a consequence, we tentatively conclude that these anti-EClpP antibodies are either the remnant of an initial bacterial challenge or could reflect the existence in some PBC patients of an asymptomatic bacterial infection.

The correlation between AMA-positivity and EClpP-positivity by immunoblot is an interesting clinical observation and future work will determine the possible relevance of these newly detected antibodies in the pathogenesis of PBC in certain patients.

Acknowledgements

We specially thank Dr. Joel Vandekerckhove, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universiteit Gent, Belgium for performing the MALDI-TOF MS sequencing experiments. We also thank Natalia Martin and Gemma Collado for their help with some of the experiments. This work was supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF99-0056), Fundación Ramón Areces, Fundación La Caixa and CAM. P. A. was supported by a grant from the Comunidad Autónoma de Madrid. I.M. is the recipient of a pre-doctoral fellowship from Fundación la Caixa.

References

1. Neuberger J, Thomson R. PBC and AMA - what is the connection? *Hepatology* 1999; 29: 271-6.
2. Baum H. Mitochondrial antigens, molecular mimicry and autoimmune disease. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 111-21.
3. Coppel RL, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis: the molecule and the mimic. *Immunol Rev* 1995; 144: 17-49.
4. Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. *J Exp Med* 1995; 181: 1835-45.
5. Van-de-Water J, Ansari A, Prindiville T, Coppel RL, Ricalton N, Kotzin BL, et al. Heterogeneity of autoreactive T cell clones specific for the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 1995; 181: 323-33.
6. Lozano F, Pares A, Borche L, Plana M, Gallart T, Rodes J, et al. Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8: 930-8.
7. Nickowitz RE, Worman HJ. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a restricted region within the cytoplasmic tail of nuclear pore membrane glycoprotein Gp210. *J Exp Med* 1993; 178: 2237-42.
8. Tartakovsky F, Worman HJ. Detection of Gp210 autoantibodies in primary biliary cirrhosis using a recombinant protein containing the predominant autoepitope. *Hepatology* 1995; 21: 495-500.
9. Nickowitz RE, Wozniak RW, Schaffner F, Worman HJ. Autoantibodies against integral membrane proteins of the nuclear envelope in patients with primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 106: 193-9.
10. Wesierska-Gadek J, Hohener H, Hitchman E, Penner E. Autoantibodies against nucleoporin p62 constitute a novel marker of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1996; 110: 840-7.
11. Lin F, Noyer CM, Ye Q, Courvalin JC, Worman HJ. Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis recognize a region within the nucleoplasmic domain of inner nuclear membrane protein LBR. *Hepatology* 1996; 23: 57-61.
12. Courvalin JC, Lassoued K, Worman HJ, Blobel G. Identification and characterization of autoantibodies against the nuclear envelope lamin B receptor from patients with primary biliary cirrhosis. *J Exp Med* 1990; 172: 961-7.
13. Arribas J, Luz-Rodriguez M, Alvarez-Do-Forno R, Castaño JG. Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1991; 173: 423-7.
14. Arribas J, Castaño JG. A comparative study of the chymotrypsin-like activity of the rat liver multicatalytic proteinase and the ClpP from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1993; 268: 21165-71.
15. Arribas J, Arizti P, Castaño JG. Antibodies against the C2 COOH-terminal region discriminate the active and latent forms of the multicatalytic proteinase complex. *J Biol Chem* 1994; 269: 12858-64.
16. de Sagarra MR, Mayo I, Marco S, Rodriguez-Vilariño S, Oliva J, Carrascosa JL, et al. Mitochondrial localization and oligomeric structure of HClpP, the human homologue of *E. coli* ClpP. *J Mol Biol* 1999; 292: 819-25.
17. Gevaert K, Demol H, Sklyarova T, Vandekerckhove J, Houthaevre T. A peptide concentration and purification method for protein characterization in the subpicomole range using matrix assisted laser desorption/ionization-postsource decay (MALDI-PSD) sequencing. *Electrophoresis* 1998; 19: 909-17.
18. Gevaert K, De Mol H, Verschelde JL, Van Damme J, De Boeck S, Vandekerckhove J. Novel techniques for identification and characterization of proteins loaded on gels in femtomole amounts. *J Protein Chem* 1997; 16: 335-42.
19. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione-transferase. *Gene* 1988; 67: 31-40.
20. Castaño JG, Mahillo E, Arizti P, Arribas J. Phosphorylation of C8 and C9 subunits of the multicatalytic proteinase by casein kinase II and identification of the C8 phosphorylation sites by direct mutagenesis. *Biochemistry* 1996; 35: 3782-9.
21. Itoh S, Ichida T, Yoshida T, Hayakawa A, Uchida M, Tashiro-Itoh T, et al. Autoantibodies against a 210 kDa glycoprotein of the nuclear pore complex as a prognostic marker in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 257-65.
22. Omagari K, Rowley MJ, Whittingham S, Jois JA, Byron SL, Mackay IR. Autoantibodies to M2 mitochondrial autoantigens in normal human sera by immunofluorescence and novel assays. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 610-6.
23. Mattalia A, Quaranta S, Leung PS, Bauducci M, Van de Water J, Calvo PL, et al. Characterization of antimitochondrial antibodies in health adults. *Hepatology* 1998; 27: 656-61.
24. O'Donohue J, McFarlane B, Bomford A, Yates M, Williams R. Antibodies to atypical mycobacteria in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 21: 887-9.
25. Tanaka A, Prindiville TP, Gish R, Solnick JV, Coppel RL, Keefe EB, et al. Are infectious agents involved in primary biliary cirrhosis? A PCR approach. *J Hepatol* 1999; 31: 664-71.

26. O'Donohue J, Fidler H, Garcia-Barcelo M, Nouri-Aria K, Williams R, McFadden J. Mycobacterial DNA not detected in liver sections from patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1998; 28: 433-8.
27. O'Donohue J, Workman MR, Rolando N, Yates M, Philpott-Howard J, Williams R. Urinary tract infections in primary biliary cirrhosis and other chronic liver diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 743-6.
28. Bach N, Schaffner F. Familial primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 20: 698-701.
29. Butler P, Hamilton-Miller J, Baum H, Burroughs AK. Detection of M2 antibodies in patients with recurrent urinary tract infection using an ELISA and purified PBC specific antigens. Evidence for a molecular mimicry mechanism in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis? *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35: 473-85.
30. Vilagut L, Pares A, Vinas O, Vila J, Jimenez de Anta MT, Rodes J. Antibodies to mycobacterial 65-kD heat shock protein cross-react with the main mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 667-72.
31. Vilagut L, Vila J, Vinas O, Pares A, Gines A, Jimenez de Anta MT, et al. Cross-reactivity of anti-*Mycobacterium gordonae* antibodies with the major mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 21: 673-7.
32. Klein R, Wiebel M, Engelhart S, Berg PA. Sera from patients with tuberculosis recognize the M2a-epitope (E2- subunit of pyruvate dehydrogenase) specific for primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 1993; 92: 308-16.

