

## Parkine, $\alpha$ -synucléine et d'autres aspects moléculaires de la maladie de Parkinson

par Olga Corti & Alexis Brice

Laboratoire de Thérapeutique et Neurologie Expérimentale, U 289 INSERM, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47, Bd de l'Hôpital, 75013 Paris. ...

Reçu le 19 décembre 2001

### RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la dégénérescence sélective et progressive des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striatale, et la présence de corps de Lewy. Plusieurs gènes responsables de formes monogéniques de cette maladie ont récemment été identifiés. Les gènes de l' $\alpha$ -synucléine et de UCHL-1 sont impliqués dans les formes familiales de la maladie transmises selon un mode autosomique dominant. Des mutations dans le gène de la Parkine

rendent compte de près de 50 % des cas familiaux avec un mode de transmission autosomique récessif, et de plus de 15 % des cas isolés avec un début avant l'âge de 45 ans. Le produit de ce gène est une E3 ubiquitine ligase impliquée dans l'ubiquitylation et la dégradation de protéines substrats par le protéasome. Ainsi, une altération de la voie ubiquitine-protéasome pourrait jouer un rôle déterminant dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson idiopathique.

### SUMMARY Parkin, $\alpha$ -synuclein and other molecular aspects of Parkinson's disease

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the progressive degeneration of the dopaminergic nigrostriatal pathway, and the presence of Lewy bodies. Over the past few years, several genes involved in inherited forms of the disease have been uncovered. In a small number of families with autosomal dominant inheritance, mutations have been identified in the genes encoding  *$\alpha$ -synuclein* and *ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1*. Mutations in

the *parkin* gene are a common cause of autosomal recessive parkinsonism with early onset, and also account for more than 15 % of isolated cases with onset before age 45. The function of Parkin, a ubiquitin ligase involved in the degradation of protein substrates by the ubiquitin-proteasome pathway, highlights that ubiquitin-mediated proteolysis may play an important role in the pathophysiology of idiopathic Parkinson's disease.

### INTRODUCTION

La maladie de Parkinson est une des maladies neurodégénératives les plus fréquentes, avec une prévalence de près de 2 % après l'âge de 65 ans. Sur le plan clinique, elle se caractérise par une akinésie, une rigidité et un tremblement de repos, une triade de symptômes qui, au début de l'évolution, répondent au traitement substitutif par la levodopa. Ces troubles moteurs sont dus à une diminution massive des taux de dopamine dans le *striatum*, liée à la dégénérescence préférentielle et progressive des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra*

*pars compacta* (SNc). Un stigmatisme neuropathologique accompagne ces lésions caractéristiques : le corps de Lewy (Forno, 1996). Il s'agit d'inclusions neuronales cytoplasmiques éosinophiles, présentes dans diverses régions cérébrales mais prédominantes dans la SNc. Bien que l'étiologie de la maladie de Parkinson idiopathique demeure à ce jour inconnue, des progrès considérables réalisés au cours de ces dernières années ont permis d'identifier les gènes responsables de plus rares formes monogéniques. Ainsi, les gènes de l' $\alpha$ -synucléine et de l'*ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1* (UCHL-1) sont impliqués dans les formes autosomiques domi-

nantes, tandis que des mutations dans le gène de la Parkinson sont une cause majeure des formes autosomiques récessives. La clarification des fonctions associées aux produits de ces gènes devrait apporter des éléments essentiels vers la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson idiopathique.

### Les protéines impliquées dans les formes familiales de maladie de Parkinson

**$\alpha$ -synucléine.** Le gène codant pour cette protéine a été le premier reconnu comme étant responsable d'une forme de maladie de Parkinson transmise selon un mode autosomique dominant. En 1997, une mutation ponctuelle faux sens fut identifiée dans ce gène (Ala53Thr) dans une famille italo-américaine ainsi que dans un petit nombre de familles grecques (Athanasidou *et al.*, 1999; Polymeropoulos *et al.*, 1997). Une deuxième mutation (Ala30Pro) responsable de la maladie fut ensuite détectée dans une famille allemande (Krüger *et al.*, 1998), mais l'absence de mutations dans d'autres cas familiaux ou isolés indique que le gène de l' $\alpha$ -synucléine n'est que rarement impliqué dans la maladie de Parkinson (Vaughan *et al.*, 1998). Une association de certains polymorphismes dans la région 5' non codante de ce gène avec la maladie de Parkinson idiopathique a été cependant observée (Krüger *et al.*, 1999).

Les phénotypes cliniques des sujets atteints dans les familles liées aux mutations du gène de l' $\alpha$ -synucléine sont compatibles avec la maladie de Parkinson idiopathique, bien que l'âge de début soit plus précoce (45 ans) et la progression paraisse plus rapide (Golbe *et al.*, 1996; Papadimitriou *et al.*, 1999). Les rares données neuropathologiques disponibles ont également démontré la présence de corps de Lewy (Golbe *et al.*, 1996). Ainsi, la ressemblance des tableaux clinique et neuropathologique indique que l'exploration des mécanismes sous-jacents à la pathogenèse de cette rare forme familiale sera aussi précieuse pour la compréhension du processus pathologique qui intervient dans la maladie de Parkinson idiopathique.

Un des arguments les plus convaincants en faveur de cette hypothèse a été apporté par la mise en évidence de l' $\alpha$ -synucléine au sein des corps de Lewy dans la maladie de Parkinson familiale ainsi qu'idiopathique (Spillantini *et al.*, 1997). L'accumulation de cette protéine au sein d'inclusions n'est cependant pas exclusive de la maladie de Parkinson, mais commune à un ensemble de maladies sous le terme d' $\alpha$ -synucléinopathies (Duda *et al.*, 2000). Comme la maladie de Parkinson, certaines de ces maladies sont caractérisées par la présence de corps de Lewy immunoréactifs à l' $\alpha$ -synucléine (Lippa *et al.*, 1998; Lippa *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2000). Des dépôts d' $\alpha$ -synucléine ont également été observés au sein des inclusions cytoplasmiques oligodendrocytaires caractéristiques de l'atrophie systématisée multiple (Gai *et al.*, 1998; Tu *et al.*, 1998). Enfin, avant même que l'implication de l' $\alpha$ -synucléine dans la maladie de Parkinson soit connue, un fragment de cette protéine avait

été identifié comme constituant non-amyloïde (NACP) des plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer (Uéda *et al.* 1993).

La fonction de l' $\alpha$ -synucléine est loin d'être élucidée. Il s'agit d'une protéine de 140 acides aminés dont le domaine N-terminal se caractérise par des répétitions imparfaites d'une série de 11 acides aminés incluant le consensus KTKEGV (Fig. 1). Ces répétitions sont suivies d'une région intermédiaire hydrophobe (NAC), puis d'une région C-terminale chargée négativement (Lavedan, 1998). Comme d'autres membres de la famille des synucléines, l' $\alpha$ -synucléine est abondamment représentée dans le cerveau, où elle se concentre au niveau des terminaisons nerveuses à proximité des vésicules synaptiques (Clayton & George, 1999). Sa capacité à lier des membranes lipidiques à travers son domaine N-terminal et son effet inhibiteur sélectif sur l'activité de l'isoforme 2 de la phospholipase D, un variant membranaire qui pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'endocytose, indiquent une possible implication dans le transport vésiculaire (Eliezer *et al.*, 2001; Jenco *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1998; Perrin *et al.*, 2000). Le phénotype induit par l'inactivation du gène de l' $\alpha$ -synucléine chez la souris suggère également que cette protéine pourrait avoir une fonction de régulateur de la neurotransmission dopaminergique qui serait dépendante de l'activité présynaptique (Abeliovich *et al.*, 2000). En effet, ces souris présentent une diminution modérée du taux de dopamine dans le *striatum* qui s'accompagne d'une atténuation de la réponse locomotrice à l'amphétamine d'une augmentation de la libération de dopamine à la suite de stimuli couplés. Ces souris ne présentent cependant aucun signe neurologique qui pourrait témoigner d'un dysfonctionnement de la voie dopaminergique nigro-striatale, voie qui par ailleurs apparaît intacte à l'examen neuropathologique. Une perte de fonction de l' $\alpha$ -synucléine ne semble donc pas être la cause de la maladie de Parkinson dans les cas familiaux liés à des mutations de ce gène.

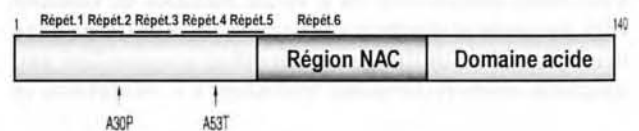


FIG. 1. – Représentation schématique de la protéine  $\alpha$ -synucléine. Les variants impliqués dans la maladie de Parkinson sont indiqués.

Se pose alors la question du mécanisme sous-jacent à la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la SNc provoquée par de tels mutations. La surexpression de l' $\alpha$ -synucléine dans différentes lignées cellulaires ainsi qu'au sein de cellules nerveuses en culture primaire augmente la vulnérabilité des cellules à l'effet de la privation de sérum, de toxines telles que la dopamine, la 6-hydroxydopamine ou le MPTP, ou encore d'un stress oxydatif (Kanda *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000). La surexpression de l' $\alpha$ -synu-

cléine humaine chez la souris conduit à la formation d'inclusions neuronales cytoplasmiques et nucléaires immunoréactives à l' $\alpha$ -synucléine et à l'ubiquitine qui, à la différence des corps de Lewy, sont de nature granulaire et non fibrillaire (Masliah *et al.*, 2000). Bien qu'aucune perte de neurones dopaminergiques dans la SN n'ait été observée, une dégénérescence des terminaisons dopaminergiques dans le *striatum* a été décrite dans la lignée qui produisait les quantités les plus importantes de la protéine. De manière intéressante, chez la drosophile transgénique pour l' $\alpha$ -synucléine normale ou mutée, la formation d'agrégats neuronaux de nature fibrillaire s'est révélée être accompagnée d'une dégénérescence progressive et sélective des neurones dopaminergique, ainsi que de l'apparition de troubles de la locomotion chez l'adulte (Feany & Bender, 2000).

Il paraît donc probable qu'un gain de fonction toxique soit à l'origine des conséquences pathologiques des mutations du gène de l' $\alpha$ -synucléine. Cet effet toxique serait à mettre en relation avec la tendance naturelle de l' $\alpha$ -synucléine à s'agréger. En effet, l' $\alpha$ -synucléine native n'adopte pas de structure secondaire stable (Weinreb *et al.*, 1996), mais peut subir des transitions de conformation en présence de membranes lipidiques ou de détergent (Davidson *et al.*, 1998; Eliezer *et al.*, 2001; Jo *et al.*, 2000; Perrin *et al.*, 2000). L'exposition de résidus hydrophobes à la surface de la protéine facilite également son oligomérisation, puis son agrégation *in vitro* en fibrilles insolubles de type amyloïde qui ressemblent aux agrégats observés dans la pathologie humaine (Conway *et al.*, 1998; Giasson *et al.*, 1999; Serpell *et al.*, 2000). Le processus d'assemblage d'oligomères d' $\alpha$ -synucléine en fibrilles paraît plus rapide pour le variant Ala53Thr que pour la protéine normale, tandis que l'effet de la mutation Ala30Pro est plus controversé (Conway *et al.*, 2000; Narhi *et al.*, 1999; Serpell *et al.*, 2000). En revanche, les deux mutations semblent accélérer la formation d'oligomères d' $\alpha$ -synucléine (protofibrilles), ce qui indique que ces espèces protéiques intermédiaires qui précèdent la formation de fibrilles insolubles pourraient être à l'origine de l'effet neurotoxique de ces protéines (Conway *et al.*, 2000). De manière intéressante, la dopamine semble inhiber l'agrégation ultérieure de ces protofibrilles en fibrilles, à travers la formation d'une liaison covalente avec l' $\alpha$ -synucléine (Conway *et al.*, 2001). Cette donnée apporte une première explication à la sélectivité de l'effet neurotoxique de l' $\alpha$ -synucléine sur les neurones dopaminergiques.

**Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1.** Une mutation faux sens (Ile93Met) a été identifiée dans le gène codant l'enzyme UCH-L1 chez deux membres d'une famille allemande atteints d'une maladie de Parkinson transmise selon un mode autosomique dominant. (Leroy *et al.*, 1998). Puisque des mutations de ce gène n'ont pas été retrouvées dans d'autres cas familiaux ou isolés de la maladie, il n'est pas clair à ce jour si la substitution Ile93Met est une mutation dominante, ou s'il s'agit d'un polymorphisme extrêmement rare qui ségrège avec la maladie. Néanmoins, l'activité catalytique du variant Ile93Met produit sous forme de protéine recom-

binante chez *Escherichia coli*, s'est révélée être réduite de 50 % par rapport à celle de la protéine native. Malgré les doutes concernant le caractère pathogène de ce variant, d'autres arguments rendent séduisante l'hypothèse d'une implication de la protéine UCH-L1 dans la maladie de Parkinson. UCH-L1 est l'une des protéines les plus abondantes dans le cerveau et elle est présente dans les corps de Lewy (Lowe *et al.*, 1990). Elle est membre d'une famille d'enzymes dites de dés-ubiquitinylation, dont la fonction est d'hydrolyser des liaisons entre des molécules d'ubiquitine est des petits adduits. Cette activité essentielle permet de recycler des molécules d'ubiquitine monomérique indispensables à l'adressage de protéines cellulaires vers la voie de dégradation par le protéasome 26S. Il est donc possible de spéculer que la perte ou la diminution de l'activité enzymatique de la protéine UCH-L1, provoquée par des mutations de son gène, pourrait compromettre l'efficacité de cette voie de dégradation et aboutir ainsi à l'accumulation de protéines mal repliées, potentiellement toxiques. Il est intéressant de souligner que, chez la souris atteinte de dystrophie axonale *gracile* due à une mutation récessive dans le gène de UCH-L1, est observée une dégénérescence des neurones sensoriels et moteurs qui s'accompagne de l'apparition de corps d'inclusion immunoréactifs à l'ubiquitine (Saigoh K, 1999). Par ailleurs, des polymorphismes du gène de UCH-L1 semblent avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la maladie de Parkinson idiopathique, ce qui est un argument supplémentaire en faveur d'une implication de ce gène dans la pathogenèse de la maladie (Maraganore *et al.*, 1999).

**Parkine.** En 1998, le gène de la Parkine fut identifié comme étant responsable d'un syndrome parkinsonien juvénile transmis selon un mode autosomique récessif (*autosomal recessive juvenile parkinsonism*, ARJP), initialement décrit au Japon (Yamamura *et al.*, 1973; Ishikawa & Tsuji, 1996; Kitada *et al.*, 1998). Cette entité clinique se caractérise par un début précoce, souvent avant l'âge de 20 ans, une dystonie des membres inférieurs, une amélioration nette des symptômes par le sommeil, ainsi qu'une excellente réponse à la levodopa associée à la survenue précoce de dyskésinésies. A la différence de la maladie de Parkinson idiopathique, l'évolution est lentement progressive. Bien que l'analyse neuropathologique ait permis de mettre en évidence une perte neuronale restreinte à la SNc, l'absence de corps de Lewy dans plusieurs cas de ARJP a donné lieu à l'hypothèse d'une cause étiologique distincte de celle de la maladie de Parkinson idiopathique (Hayashi *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 1998; van de Warrenburg *et al.*, 2001).

Depuis la découverte des premières mutations du gène de la Parkine – des délétions d'exons à l'état homozygote (Kitada *et al.*, 1998) –, de nombreuses nouvelles altérations de ce gène furent identifiées chez des sujets de diverses ethnies. Ces altérations comprennent des combinaisons variables de délétions et de multiplications d'exons, ainsi que diverses mutations non-sens et de plus fréquentes mutations faux-sens dont la majorité affecte le domaine C-terminal de la protéine (Abbas *et al.*, 1999;

Hattori *et al.*, 1998; Hattori *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1998; Lücking *et al.*, 1998; Lücking *et al.*, 2000; Maruyama *et al.*, 2000; Nisipeanu *et al.*, 1999). Une implication du gène de la Parkine a été ainsi démontrée dans près de 50 % des cas familiaux de maladie de parkinson avec un début avant l'âge de 45 ans, mais aussi dans plus de 15 % des cas isolés avec un début précoce. De manière intéressante, il s'est avéré que le syndrome parkinsonien dû à des mutations dans le gène de la Parkine n'est pas obligatoirement juvénile, comme initialement décrit au Japon, mais que l'âge de début peut atteindre 64 ans (Klein *et al.*, 2000). D'autre part, le spectre clinique s'est révélé être plus large, incluant des cas proches d'un phénotype de dystonie dopa-sensible (Tassin *et al.*, 2000), et d'autres indistinguables de la maladie de Parkinson idiopathique (Lücking *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2000). Par ailleurs, la mesure de capture de fluorodopa par tomographie à émission de positron dans le noyau caudé et le putamen, un indice qui corrèle avec la perte des neurones dopaminergiques dans la SNC, a montré une diminution similaire de ce paramètre chez de sujets porteurs de mutations du gène de la Parkine et des sujets atteints de maladie de Parkinson idiopathique (Broussolle *et al.*, 2000; Hilker *et al.*, 2001). Avec la récente découverte du stigmate neuropathologique caractéristique de la maladie de Parkinson idiopathique (les corps de Lewy) chez un sujet atteint d'un syndrome parkinsonien dû à deux mutations composites du gène de la Parkine, il est possible de conclure que ces deux entités cliniques pourraient être plus proches du point de vue étiologique qu'il avait été jusque-là envisagé.

Les douze exons du gène de la Parkine codent une protéine de 465 acides aminés dont les domaines structuraux ont donné les premières indications concernant sa fonction (Fig. 2). La Parkine présente un domaine N-terminal modérément homologue à l'ubiquitine, et deux motifs dits *RING finger*, intercalés par un domaine *in-between RING finger* (IBR), à son extrémité C-terminale. Au cours des dernières années, un grand nombre de protéines à motif *RING finger* se sont révélées être impliquées dans l'ubiquitinylation et ainsi la dégradation de protéines substrats par le protéasome (Joazeiro & Weissman, 2000). L'ubiquitinylation de protéines est un processus finement régulé qui met en jeu trois étapes prin-

cipales comprenant : (1) la formation d'une liaison thioester entre une molécule d'ubiquitine et l'enzyme E1 (ubiquitin-activating enzyme) au cours d'une réaction qui nécessite de l'ATP; (2) le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E1 sur une protéine E2 (ubiquitin conjugating enzyme); (3) l'ubiquitinylation d'une protéine substrat spécifique par un complexe E2/E3 (protein ubiquitin ligase). Le substrat polyubiquitinylé est ensuite dégradé par le protéasome (Fig. 3). Comme pour d'autres protéines de type *RING finger*, une fonction de E3 ubiquitine ligase a été récemment démontrée pour la Parkine (Imai *et al.*, 2000; Shimura *et al.*, 2000). Cette fonction s'exerce grâce à l'interaction du domaine *RING IBR RING* de la Parkine avec les protéines E2 cytoplasmiques UbcH7 et UbcH8, ou les protéines Ubc6 et Ubc7 associées au reticulum endoplasmique. Il a été montré que des mutations du gène de la Parkine retrouvées dans des cas familiaux de maladie de Parkinson, abolissent l'interaction de la protéine avec UbcH7 ou UbcH8 et/ou compromettent ainsi son activité E3-ligase.

La perte de la fonction E3 ubiquitine ligase semble donc être la cause de la maladie de Parkinson due à des mutations du gène de la Parkine. L'accumulation anormale de protéines intracellulaires non ubiquitinyliées, secondaire à cette perte de fonction, pourrait ainsi représenter la première étape d'un mécanisme moléculaire complexe menant à la mort sélective des neurones dopaminergiques de la SNC. En accord avec cette idée, une augmentation de l'expression endogène de la Parkine a été observée dans des conditions de stress provoqué par l'accumulation de protéines mal repliées au sein de cellules en culture (Imai *et al.*, 2000). De plus, la surexpression de la Parkine semble protéger les cellules dans de telles conditions, ce qui est un indice en faveur de son implication dans la dégradation de protéines dont la conformation est altérée. De manière intéressante, un des substrats de l'activité E3-ligase de la Parkine récemment identifiés, le récepteur transmembranaire putatif Pael-R (*parkin-associated endothelin receptor-like receptor*), tend à former des inclusions insolubles et ubiquitinyliées, et à induire une mort cellulaire après transfection (Imai *et al.*, 2001). Dans ce cas également, la surexpression de la Parkine protège les cellules de la toxicité induite par

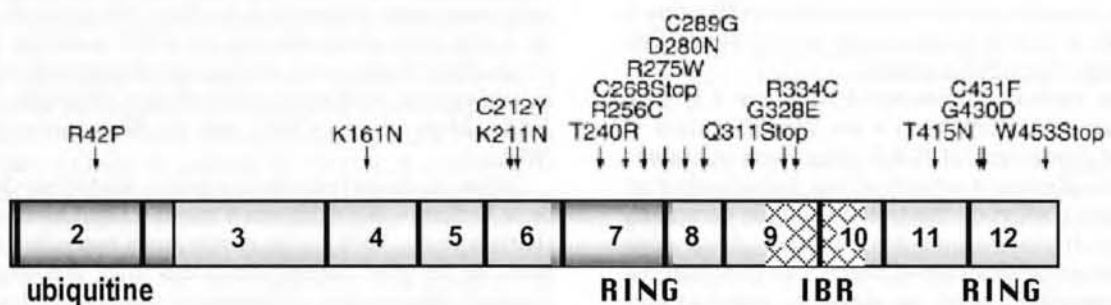


FIG. 2. – Représentation schématique de la Parkine et de ces domaines fonctionnels. Les chiffres indiquent les douze exons du gène de la Parkine. Les mutations ponctuelles conduisant à des substitutions d'acides aminés ou à la synthèse de protéines tronquées sont indiquées.

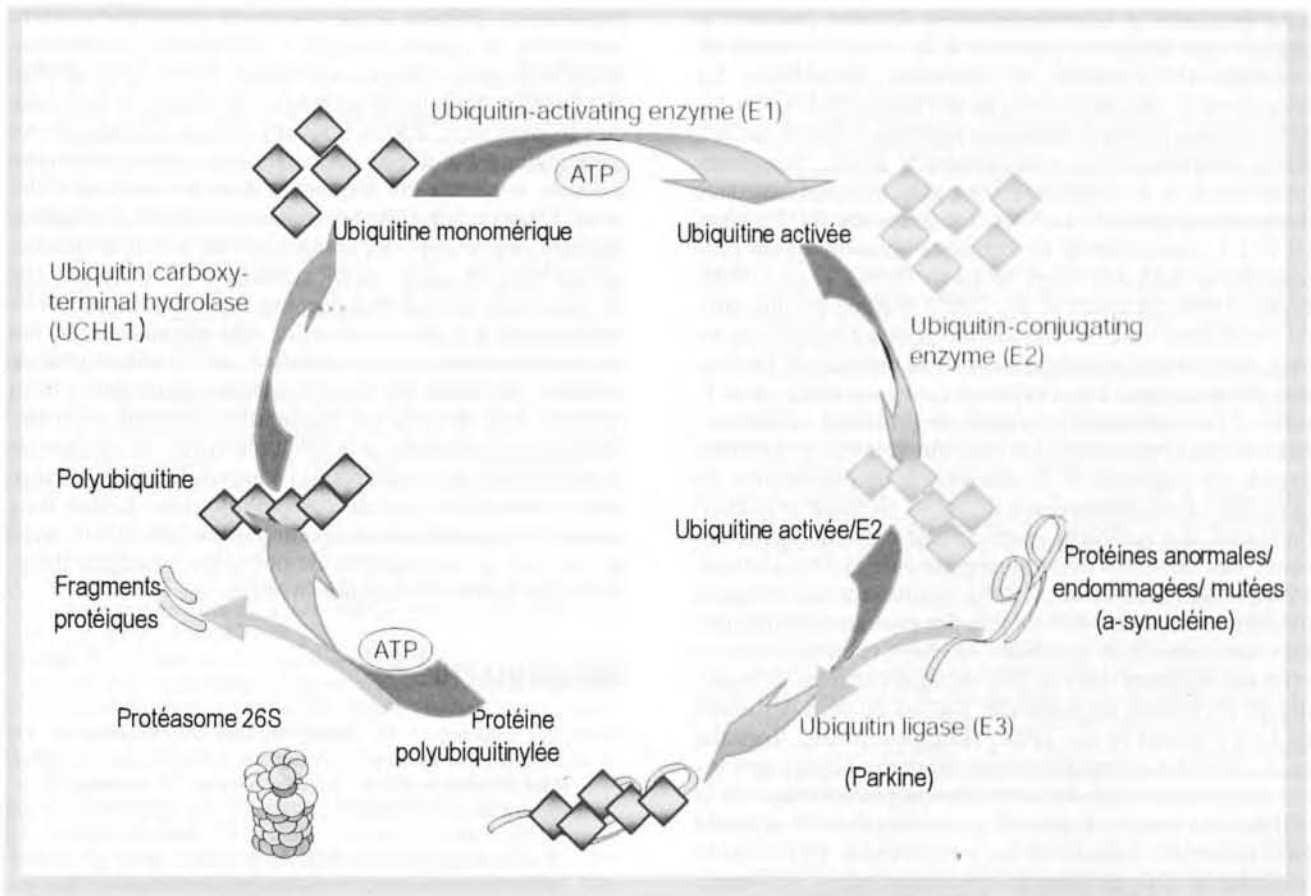


FIG. 3. – La maladie de Parkinson et la voie de dégradation ubiquitine-protéasome (image modifiée d'après McNaught *et al.*, 2001).

l'agrégation de ce récepteur. Par ailleurs, l'accumulation de Pael-R sous forme de protéine insoluble dans le cerveau de sujets atteints de maladie de Parkinson due à des mutations du gène de la Parkine, est un fort indice en faveur d'un rôle de cette protéine dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la voie nigro-striatale.

La Parkine paraît aussi agir sur des substrats synaptiques. Zhang et collaborateurs ont montré son implication dans l'ubiquitinylation et le contrôle de la dégradation de CDCrel-1, une GTPase associée aux vésicules synaptiques qui pourrait réguler la libération synaptique de neurotransmetteurs (Zhang *et al.*, 2000). Un rôle de CDCrel-1 dans le relargage synaptique de la dopamine reste à prouver, mais il est concevable qu'une altération de la stabilité de cette protéine, induite par des mutations du gène de la Parkine, puisse interférer avec ce processus et contribuer au développement de la maladie. D'autre part, Shimura et collaborateurs ont mis en évidence un rôle de la Parkine dans le contrôle du catabolisme d'une isoforme minoritaire O-glycosylée de l' $\alpha$ -synucléine ( $\alpha$ Sp22). Cette découverte a permis d'établir un premier lien fonctionnel entre les produits de deux gènes impliqués dans la maladie de Parkinson (Shimura *et al.*, 2001). Néanmoins, bien qu'une accumulation modérée de la protéine  $\alpha$ Sp22 ait été observée dans les

cerveaux de sujets atteints d'un syndrome parkinsonien juvénile dû à une perte de fonction de la Parkine, la fonction de cette rare forme d' $\alpha$ -synucléine et sa réelle implication dans la pathologie reste à prouver. Malgré ces incertitudes, un nouvel élément est venu récemment renforcer l'hypothèse selon laquelle Parkine et  $\alpha$ -synucléine pourraient interagir dans une même voie pathogénique. Chung et collaborateur ont en effet montré que la synphiline, une protéine partenaire de l' $\alpha$ -synucléine identifiée au cours d'un crible double hybride chez la levure, est également un substrat de la Parkine (Chung *et al.*, 2001). Lorsqu'elle est surexprimée avec l' $\alpha$ -synucléine au sein de cellules en culture, la synphiline – qui est aussi une composante des corps de Lewy – forme des inclusions cytoplasmiques immunoréactives aux deux protéines, qui peuvent être ubiquitinylées en présence de Parkine. Ainsi, il est tentant de spéculer que l' $\alpha$ -synucléine, la synphiline et la Parkine pourraient être impliquées dans un mécanisme moléculaire commun conduisant à la formation des corps de Lewy.

#### De la maladie de Parkinson à la voie de dégradation ubiquitine-protéasome

Au cours de ces dernières années, l'identification de gènes responsables de syndromes parkinsoniens d'ori-

gine familiale et la caractérisation de leur produits, a apporté des éléments précieux à la compréhension de l'étiologie de la maladie de Parkinson idiopathique. La découverte d'une implication de la Parkine et de UCH-L1 dans certains de ces syndromes, a permis d'établir un lien direct entre des déficits moléculaires de la voie ubiquitine-protéasome et la dégénérescence sélective des neurones dopaminergiques de la SNc. La présence de Parkine, UCH-L1, ubiquitine et de certaines sous-unités du protéasome au sein des corps de Lewy (Lowe *et al.*, 1990; Forno, 1996; Shimura *et al.*, 2001) indique qu'une altération de cette voie de dégradation pourrait aussi jouer un rôle crucial dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson idiopathique. Les corps de Lewy seraient ainsi le reflet d'une agrégation massive de protéines endommagées ou mal repliées, ayant lieu lorsque leur production excède les capacités de la machinerie de dégradation de la cellule. Des phénomènes de stress oxydant et d'excitotoxicité, qui semblent jouer un rôle dans la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc (Jenner, 1998; Rodriguez *et al.*, 1998), pourraient contribuer à modifier de manière irréversible des protéines cellulaires. Des taux élevés de protéines oxydées et nitrées ont en effet été observés dans la SNc de sujets atteints de maladie de Parkinson idiopathique, parfois au sein des corps de Lewy (Good *et al.*, 1998; Halliwell, 2001; Yoritaka *et al.*, 1996). Ces modifications pourraient aussi concerner des composantes de la machinerie protéolytique de la cellule, et rendre compte de la diminution des activités enzymatiques associées au protéasome qui semble atteindre la SNc en voie de dégénérescence (McNaught & Jenner, 2001). La séquestration de composants du protéasome et d'enzymes de la voie d'ubiquitinylation au sein d'agrégats de protéines endommagées pourrait accentuer ce phénomène, et conduire progressivement à la formation des corps de Lewy. La maladie de Parkinson idiopathique est aussi associée à une diminution modérée de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire dans la SNc (Schapira, 1999). Le déficit énergétique qui en résulte pourrait non seulement conduire à une augmentation de la production de radicaux libres, et par conséquent, du stress oxydant au sein des neurones dopaminergiques, mais également compromettre de manière directe l'ubiquitinylation et la dégradation des protéines, deux processus nécessitant de l'énergie.

## CONCLUSIONS

La récente découverte de la fonction E3-ligase de la Parkine, a permis de démontrer qu'un déficit de la voie de dégradation des protéines mettant en jeu leur ubiquitinylation peut conduire de manière directe à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc, et représenter ainsi la cause d'une maladie de Parkinson d'origine génétique. L'implication de la voie ubiquitine-protéasome avait été longtemps soupçonnée non seulement dans la pathogénèse de la maladie de Parkinson, mais également dans celle de nombreuses autres maladies neurodégénératives. La présence, au sein de sous-

populations définies de neurones, de corps d'inclusions insolubles et immunoréactifs à l'ubiquitine, extracellulaires, cytoplasmiques ou nucléaires, est en effet un stigmate neuropathologique commun à la plupart de ces maladies (Chung *et al.*, 2001). Souvent, lorsque la cause de ces pathologies est d'origine génétique, les variants protéiques associés se retrouvent séquestrés dans les corps d'inclusions. Dans certains cas, ces protéines peuvent interagir de manière directe avec des composants de la voie ubiquitine-protéasome, un indice supplémentaire d'un rôle plus vaste de cette voie dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives. La clarification du rôle physiologique des protéines associées à ces maladies, de l'éventuel gain de fonction provoqué par leurs mutations, ainsi que de leur relation avec la voie de dégradation ubiquitine-protéasome, sera essentielle à la compréhension de la cascade d'événements moléculaires qui sous-tendent la mort neuronale caractéristique de ces pathologies. A plus long terme, ces approches physiopathologiques devraient ouvrir la voie au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces maladies invalidantes.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abbas N., Lücking C. B., Ricard S., Dürr A., Bonifati V., De Michele G., Bouley S., Vaughan J. R., Gasser, T., Marconi R., Broussolle E., Brefel-Courbon C., Harhangi B. S., Oostra B. A., Fabrizio E., Böhme G. A., Pradier L., Wood N. W., Filla A., Meco G., Deneffe P., Agid Y. & Brice, A., A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease, *Hum. Mol. Genet.*, 1999, 8, 567-574.
- 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. & Rosenthal A., Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 2000, 25, 239-252.
- Athanassiadou A., Voutsinas G., Psiouri L., Leroy E., Polymeropoulos M. H., Iliac A., Maniatis G. M., & Papapetropoulos T., Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein, *Am. J. Hum. Genet.*, 1999, 65, 555-558.
- Broussolle E., Lücking C. B., Ginovart N., Pollak P., Remy P. & Dürr A., [18 F]-dopa PET study in patients with juvenile-onset PD and parkin gene mutations, *Neurology*, 2000, 55, 877-879.
- Chung K. K., Zhang Y., Lim K. L., Tanaka Y., Huang H., Gao J., Ross C. A., Dawson V. L. & Dawson T. M., Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease, *Nat. Med.*, 2001, 7, 1144-1150.
- Chung K. K., Dawson V. L. & Dawson T. M., The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders, *Trends in Neurol Sci.* 2001, 24, S7-S14.
- Clayton D. F. & George J. M., Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders, *J. Neurosci. Res.*, 1999, 58, 120-129.
- Conway K. A., Harper J. D. & Lansbury P. T., Accelerated *in vitro* fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease, *Nat. Med.*, 1998, 4, 1318-1320.
- Conway K. A., Harper J. D. & Lansbury P. T., Jr., Fibrils formed *in vitro* from alpha-synuclein and two mutant forms linked



- to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry*, 2000, 39, 2552-2563.
- Conway K. A., Lee S. J., Rochet J. C., Ding T. T., Williamson R. E. & Lansbury, P. T., Jr., 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*, 2000, 97, 571-576.
- Conway K.A., Rochet J.-C., Bienganski R.M. & Lansbury, P.T. Jr., Kinetic stabilization of the  $\alpha$ -synuclein protofibril by a dopamine- $\alpha$ -synuclein adduct. *Science*, 2001, 294, 1346-1349.
- Davidson, W. S., Jonas A., Clayton D. F. & George J. M., Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 9443-9449.
- Duda J. E., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Neuropathology of synuclein aggregates. *J. Neurosci. Res.* 2000, 61, 121-127.
- Eliezer D., Kutluay E., Bussell R., Jr. & Browne G., Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.*, 2001, 307, 1061-1073.
- Feany M. B. & Bender W. W., A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature*, 2000, 404, 394-398.
- Forno L. S., Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1996, 55, 259-272.
- Gai W. P., Power J. H., Blumberg P. C. & Blessing W. W., Multiple-system atrophy: a new alpha-synuclein disease?. *Lancet*, 1998, 352, 547-548.
- Giasson B. I., Uryu K., Trojanowski J. Q. & Lee V. M., Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 7619-7622.
- Golbe L. I., Di Iorio G., Sanges G., Lazzarini A. M., La Sala S., Bonavita V. & Duvoisin R. C., Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann. Neurol.*, 1996, 40, 767-775.
- Good P. F., Hsu A., Werner P., Perl D. P. & Olanow C. W., Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1998, 57, 338-342.
- Halliwel B., Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*, 2001, 18, 685-716.
- Hattori N., Kitada T., Matsumine H., Asakawa S., Yamamura Y., Yoshino H., Kobayashi T., Yokochi M., Wang M., Yoritaka A., Kondo T., Kuzuhara S., Nakamura S., Shimizu N. & Mizuno Y., Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann. Neurol.*, 1998, 44, 935-941.
- Hattori N., Matsumine H., Asakawa, S., Kitada T., Yoshino H., Elibol B., Brookes A. J., Yamamura Y., Kobayashi T., Wang M., Yoritaka A., Minoshima S., Shimizu N. & Mizuno Y., Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 249, 754-758.
- Hayashi S., Wakabayashi K., Ishikawa A., Nagai H., Saito M., Maruyama M., Takahashi T., Ozawa T., Tsuji S. & Takahashi H., An autopsy case of autosomal-recessive juvenile parkinsonism with a homozygous exon 4 deletion in the parkin gene. *Mov. Disord.*, 2000, 15, 884-888.
- Hilker R., Klein C., Ghaemi M., Kis B., Strotmann T., Ozelius L. J., Lenz O., Vieregge P., Herholz K., Heiss W. D. & Pramstaller P. P., Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. *Ann. Neurol.*, 2001, 49, 367-376.
- Imai Y., Soda M., Inoue H., Hattori N., Mizuno Y. & Takahashi R., An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, 2001, 105, 891-902.
- Imai Y., Soda M. & Takahashi R., Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 35661-35664.
- Ishikawa A. & Tsuji S., Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology*, 1996, 47, 160-166.
- Jenco J. M., Rawlingson A., Daniels B. & Morris A. J., Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*, 1998, 37, 4901-4909.
- Jenner P., Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 1998, 13, 24-34.
- Jensen P. H., Nielsen M. S., Jakes R., Dotti C. G. & Goedert M., Binding of alpha-synuclein to brain vesicles is abolished by familial Parkinson's disease mutation. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 26292-26294.
- Jo E., McLaurin J., Yip C. M., St George-Hyslop P. & Fraser P. E., alpha-Synuclein membrane interactions and lipid specificity. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 34328-34334.
- Joazeiro C. & Weissman AM., RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 2000, 102, 549-552.
- Kanda S., Bishop J. F., Eglitis M. A., Yang Y. & Mouradian M. M., Enhanced vulnerability to oxidative stress by alpha-synuclein mutations and C-terminal truncation. *Neuroscience*, 2000, 97, 279-2784.
- Kitada T., Asakawa S., Hattori N., Matsumine H., Yamamura Y., Minoshima S., Yokochi M., Mizuno Y. & Shimizu N., Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 1998, 392, 605-608.
- Klein C., Pramstaller P. P., Kis B., Page C. C., Kann M., Leung J., Woodward H., Castellan C. C., Scherer M., Vieregge P., Breakefield X. O., Kramer P. L. & Ozelius L. J., Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann. Neurol.*, 2000, 48, 65-71.
- Krüger R., Kuhn W., Müller T., Woitalla D., Graeber M., Kosel S., Przuntek H., Epplen J. T., Schols L. & Riess O., Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.*, 1998, 18, 106-8.
- Krüger R., Vieira-Saecker A. M., Kuhn W., Berg D., Müller T., Kuhl N., Fuchs G. A., Storch A., Hungs M., Woitalla D., Przuntek H., Epplen J. T., Schols L. & Riess O., Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined alpha-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann. Neurol.*, 1999, 45, 611-617.
- Lavedan C., The synuclein family. *Genome Res.*, 1998, 8, 871-880.
- Lee M., Hyun D., Halliwel B. & Jenner P., Effect of the overexpression of wild-type or mutant alpha-synuclein on cell susceptibility to insult. *J. Neurochem.*, 2001, 76, 998-1009.
- Leroy E., Anastasopoulos D., Konitsiotis S., Lavedan C. & Polymeropoulos M. H., Deletions in the Parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum. Genet.*, 1998, 103, 424-427.
- Leroy E., Boye, R., Auburger G., Leube B., Ulm G., Mezey E., Harta G., Brownstein M. J., Jonnalagada S., Chernova T., Dehejia, A., Lavedan C., Gasser T., Steinbach P. J., Wilkinson K. D. & Polymeropoulos M. H., The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 1998, 395, 451-452.
- Lippa C. F., Fujiwara H., Mann D. M., Giasson B., Baba M., Schmidt M. L., Nee L. E., O'Connell B., Pollen D. A., St George-Hyslop P., Ghetti B., Nochlin D., Bird T. D., Cairns N. J., Lee V. M., Iwatsubo T. & Trojanowski J. Q., Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am. J. Pathol.*, 1998, 153, 1365-1370.
- Lippa C. F., Schmidt M. L., Lee V. M. & Trojanowski J. Q., Antibodies to alpha-synuclein detect Lewy bodies in many Down's syndrome brains with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 1999, 45, 353-7.
- Lowe J., McDermott H., Landon M., Mayer R. J. & Wilkinson K. D., Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PCP 9.5) is

- selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases, *J. Pathol.*, 1990, 161, 153-160.
- Lücking C. B., Abbas N., Dürr A., Bonifati V., Bonnet A. M., de Broucker T., De Michele G., Wood N. W., Agid Y. & Brice A., Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group, *Lancet*, 1998, 352, 1355-1356.
- Lücking C. B., Dur, A., Bonifati V., Vaughta, J., De Michele G., Gasser T., Harhangi B. S., Meco G., Deneffe P., Wood N. W., Agid Y. & Brice A., Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 2000, 342, 1560-1567.
- Maraganore D. M., Farrer M. J., Hardy J. A., Lincoln S. J., McDonnell S. K. & Rocca W. A., Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease, *Neurology*, 1999, 53, 1858-1860.
- Maruyama M., Ikeuchi T., Saito M., Ishikawa A., Yuasa T., Tanaka H., Hayashi S., Wakabayashi K., Takahashi H. & Tsuji S., Novel mutations, pseudo-dominant inheritance, and possible familial affects in patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Ann. Neurol.*, 2000, 48, 245-250.
- Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Mallory M., Hashimoto M., Takeda A., Sagar Y., Sisk A. & Muck L., Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 2000, 287, 1265-1269.
- McNaught K. S. & Jenner P., Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 2001, 297, 191-194.
- McNaught K. S., Olanow C. W., Halliwell B., Isacson O. & Jenner P., Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease, *Nature Rev. Neurosci.*, 2001, 2, 589-594.
- Mori H., Kondo T., Yokochi M., Matsumine H., Nakagawa-Hattori Y., Miyake T., Suda K. & Mizuno Y., Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q, *Neurology*, 1998, 51, 890-892.
- 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. & Citron M. (1999). Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 9843-9846.
- Nisipeanu P., Inzelberg R., Blumen S. C., Carasso R. L., Hattori N., Matsumine H. & Mizuno Y., Autosomal-recessive juvenile parkinsonism in a Jewish Yemenite kindred: mutation of parkin gene, *Neurology*, 1999, 53, 1602-1604.
- Papadimitriou A., Veletza V., Hadjigeorgiou G. M., Patrikiou A., Hirano M. & Anastasopoulos I., Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance?, *Neurology*, 1999, 52, 651-654.
- Perrin R. J., Woods W. S., Clayton D. F. & George J. M., Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids. Structural analysis using site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 34393-34398.
- 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., Lazzarin A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I. & Nussbaum R. L., Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease, *Science*, 1997, 276, 2045-2047.
- Rodriguez M. C., Obeso J. A. & Olanow C. W., Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection, *Ann. Neurol.*, 1999, 44, S175-188.
- Saigoh K., Wang Y. L., Suh J. G., Yamanishi T., Sakai Y., Kiyosawa H., Harada T., Ichihara N., Wakana S., Kikuchi T. & Wada K., Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat. Genet.*, 1999, 23, 47-51.
- Schapiro A. H., Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia & Friedreich's ataxia, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1410, 159-170.
- Serpell L. C., Berriman J., Jakes R., Goedert M. & Crowther R. A., Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2000, 97, 4897-4902.
- Shimura H., Hattori N., Kubo S., Mizuno Y., Asakawa S., Mino-shima S., Shimizu N., Iwai K., Chiba T., Tanaka K. & Suzuki T., Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase, *Nat. Genet.*, 2000, 25, 302-305.
- Shimura H., Schlossmacher M. G., Hattori N., Frosch M. P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K. S. & Selkoe D. J., Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease, *Science*, 2001, 293, 263-269.
- Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee V. M., Trojanowski J. Q., Jakes R. & Goedert M., Alpha-synuclein in Lewy bodies, *Nature*, 1997, 388, 839-840.
- Tassin J., Dürr A., Bonnet A. M., Gil R., Vidailhet M., Lücking C. B., Goas J. Y., Durif F., Abada M., Echenne B., Motte J., Lagucny A., Lacomblez L., Jedynak P., Bartholome B., Agid Y. & Brice A., Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or Parkin mutations? *Brain*, 2000, 123, 1112-1121.
- Tu P. H., Galvin J. E., Baba M., Giasson B., Tomita T., Leight S., Nakajo S., Iwatsubo T., Trojanowski J. Q. & Lee V. M., Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein, *Ann. Neurol.*, 1998, 44, 415-422.
- Ueda K., Fukushima H., Masliah E., Xia Y., Iwai A., Yoshimoto M., Otero D. A., Kondo J., Ihara Y., Saitoh T., Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90, 11282-11286.
- Vaughan J. R., Farrer M. J., Wszolek Z. K., Gasser T., Dürr A., Agid Y., Bonifati V., DeMichele G., Volpe G., Lincoln S., Bretelet M., Meco G., Brice A., Marsden C. D., Hardy J. & Wood N. W., Sequencing of the alpha-synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (GSPD), *Hum. Mol. Genet.*, 1998, 7, 751-753.
- van de Warrenburg B. P. C., Lammens M., Lücking C. B., Deneffe P., Wesseling P., Booi J., Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations, *Neurology*, 2001, 56, 555-557.
- Weinreb P. H., Zhen W., Poon A. W. & Conway K. A., Lansbury P. T. Jr., NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded, *Biochemistry*, 1996, 35, 13709-13715.
- Yamamura Y., Sobue I., Ando K., Iida M. & Yanagi T., Paralysis agitans of early onset with marked diurnal fluctuation of symptoms, *Neurology*, 1973, 23, 239-244.
- Yamazaki M., Arai Y., Baba M., Iwatsubo T., Mori O., Katayama Y. & Oyanagi K., Alpha-synuclein inclusions in amygdala in the brains of patients with the parkinsonism-dementia complex of Guam, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2000, 59, 585-591.
- Yoritaka A., Hattori N., Uchida K., Tanaka M., Stadtman E. R. & Mizuno Y., Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-nonenal protein adducts in Parkinson disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1996, 93, 2696-2701.
- Zhang Y., Gao J., Chung K. K., Huang H., Dawson V. L. & Dawson T. M., Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2000, 97, 13354-13359.
- Zhou W., Hurlbert M. S., Schaack J., Prasad K. N. & Freed C. R., Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells, *Brain Res.*, 2000, 866, 33-43.