



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI MILANO

Correlazione tra profilo genetico e biochimico di Pin1 nella malattia di Alzheimer

Beatrice Arosio

Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi di Milano
U.O. di Geriatria, Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore
Policlinico, Milano

La fosforilazione reversibile delle proteine rappresenta un meccanismo di “signaling” che regola l’attività delle proteine stesse

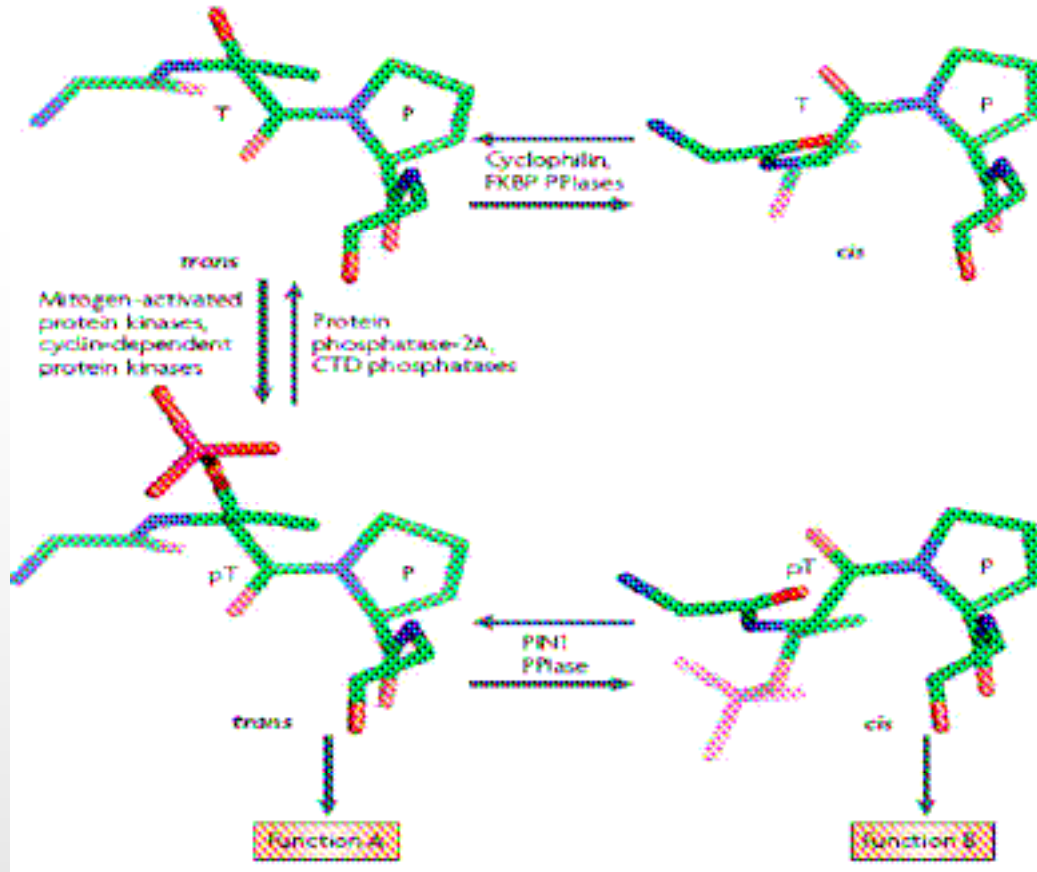
The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease

Kun Ping Lu and Xiao Zhen Zhou

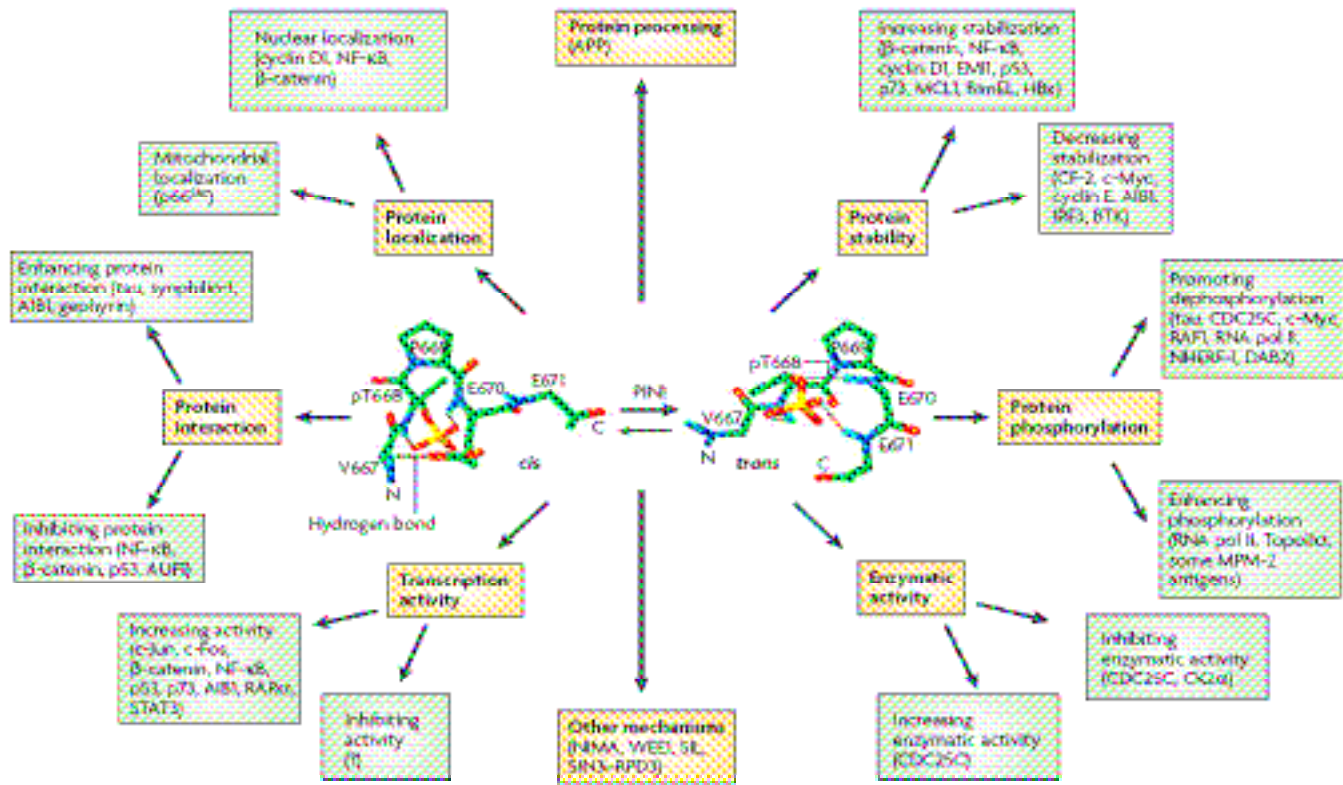
Abstract | Protein phosphorylation regulates many cellular processes by causing changes in protein conformation. The prolyl isomerase PIN1 has been identified as a regulator of phosphorylation signalling that catalyses the conversion of specific phosphorylated motifs between the two completely distinct conformations in a subset of proteins. PIN1 regulates diverse cellular processes, including growth-signal responses, cell-cycle progression, cellular stress responses, neuronal function and immune responses. In line with the diverse physiological roles of PIN1, it has also been linked to several diseases that include cancer, Alzheimer's disease and asthma, and thus it might represent a novel therapeutic target.

Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2007; 8: 904-917

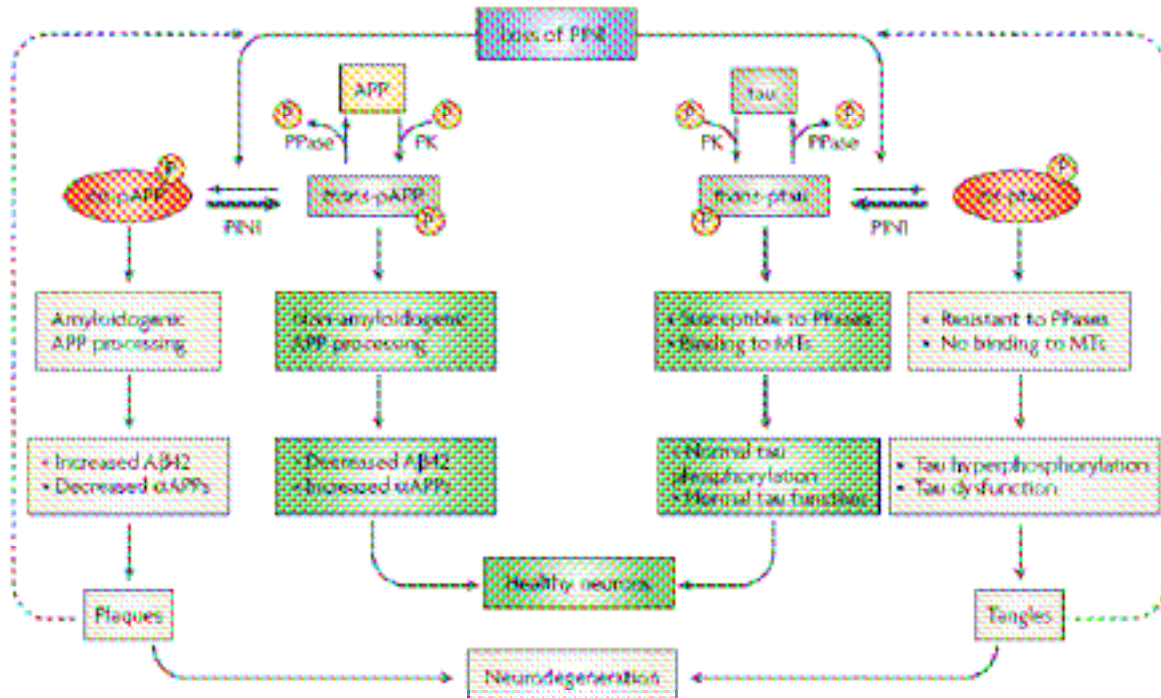
Box 1 | PIN1-catalysed conformational switch of pSer/Thr-Pro motifs



Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2007; 8: 904-917



Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2007; 8: 904-917



Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2007; 8: 904-917

Pinning Down Signaling in the Immune System: The Role of the Peptidyl-Prolyl Isomerase Pin1 in Immune Cell Function

S. Esnault, Z.J. Shen and J.S. Malter

Critical Revieweres™ in Immunology 2008; 28 (1): 45-60

A new Twist to Adaptor Proteins Contributes to Regulation of Lymphocyte Cell signaling

N. Isakov

Trends in Immunology 2008; 29 (8): 388-396

The Prolyl Isomerase Pin1 Acts as a novel molecular Switch for TNF-alpha-induced Priming of the NADPH oxidase in human neutrophils

T. Boussetta, M.A. Gourgerot-Pocidalò, G Hayem et al.

Blood 2010 October

PIN1 promoter polymorphisms are associated with Alzheimer's disease

L. Segat^a, A. Pontillo^a, G. Annoni^c, D. Trabattoni^d, C. Vergani^e,
M. Clerici^d, B. Arosio^{e,*}, S. Crovella^{a,b}

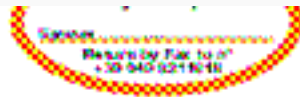
^a Department of Reproductive and Developmental Sciences, University of Trieste, Italy

^b Genetics Service, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy

^c Department of Clinical Medicine, Prevention and Medical Biotechnology, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy

^d DISP LITA VIALBA, University of Milan, Milan, Italy

^e Department of Internal Medicine, University of Milan, Geriatrics Unit, Ospedale Maggiore Policlinico, Fondazione IRCCS Milan, Italy



Aging Clinical and Experimental Research

PIN-1 promoter polymorphisms in mild cognitive impairment and susceptibility to Alzheimer's disease: a preliminary report

Beatrice Arosio¹, Ludovica Segat², Michele Milanese², Lorenza Galimberti¹, Carmen Calabrest¹, Mariella Zanetti¹, Daria Trabattoni⁴, Giorgio Annoni⁵, Sergio Crovella^{2,3}, and Carlo Vergani¹

¹Geriatric Unit, Department of Internal Medicine, University of Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, IRCCS Milano, ²Department of Reproductive and Developmental Sciences, University of Trieste, ³Genetic Service, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, ⁴DISP LITA VIALBA, University of Milano, Milano, and ⁵DIMEP, University of Milano-Bicocca, Milano, Italy

Scopo

Ottenere informazioni con valenza diagnostica e prognostica sulla base delle correlazioni tra profilo genetico e biochimico di Pin1 in cellule mononucleate periferiche (PBMCs) di pazienti con malattia di Alzheimer (AD) paragonati a controlli (CT)

Casistica

- 32 pazienti AD (criteri: DSMIV, NINCDS-ADRDA); età media 79.5 ± 6.3 anni
- 28 controlli senza deficit cognitivo confrontabili per sesso ed età

Metodi

- PCR-RFLP per genotipo ApoE (Esone 4: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$)
- PCR-RFLP per genotipo Pin1 (-842 G/C e -667 T/C)
- Espressione genica di Pin1 mediante real-time PCR e calcolo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$
- Percentuale di metilazione del promotore mediante real-time PCR e calcolo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Metodi

ESTRAZIONE DNA

- PCR-RFLP per genotipo ApoE (Esone 4: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$)
- PCR-RFLP per genotipo Pin1 (-842 G/C e -667 T/C)
- Espressione genica di Pin1 mediante real-time PCR e calcolo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$
- Percentuale di metilazione del promotore mediante real-time PCR e calcolo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Metodi

ESTRAZIONE DNA

- PCR-RFLP per genotipo ApoE (Esone 4: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ e $\epsilon 4$)
- PCR-RFLP per genotipo Pin1 (-842 G/C e -667 T/C)

ESTRAZIONE RNA DA PBMC

- Espressione genica di Pin1 mediante real-time PCR e calcolo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- Percentuale di metilazione del promotore mediante real-time PCR e calcolo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Metodi

- livelli di espressione proteica → test ELISA
- fosforilazione in S16 → western blot

Metodi

ESTRAZIONE PROTEINE TOTALI DA PBMC

- livelli di espressione proteica → test ELISA
- fosforilazione in S16 → western blot

Metodi

ESTRAZIONE PROTEINE TOTALI DA PBMC

- livelli di espressione proteica → test ELISA
- fosforilazione in S16 → western blot

LISATO DI PBMC

- funzionalità → saggio di attività

Metodi

ESTRAZIONE PROTEINE TOTALI DA PBMC

- livelli di espressione proteica → test ELISA
- fosforilazione in S16 → western blot

LISATO DI PBMC

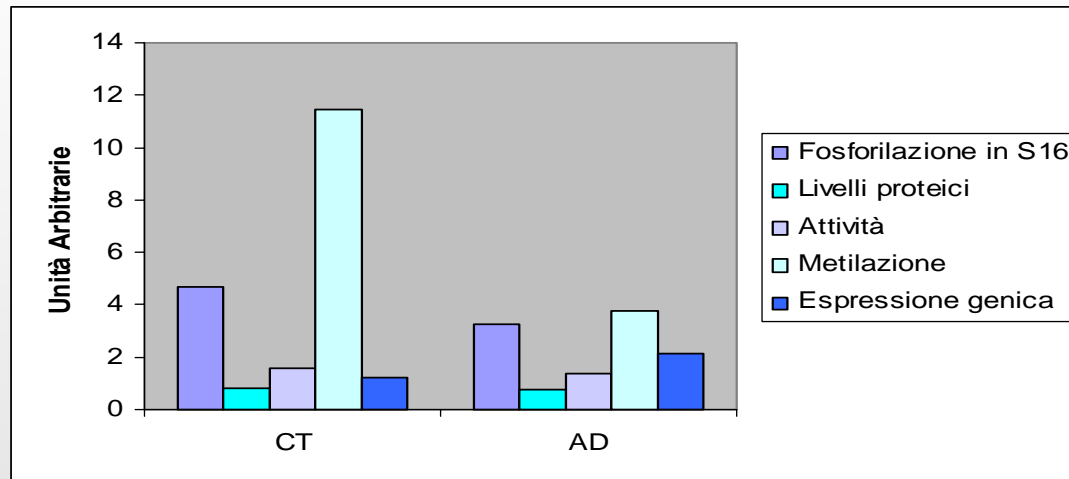
- funzionalità → saggio di attività

ANALISI STATISTICA

- Outliers analysis, test del χ^2 , T test (SPSS version 17)

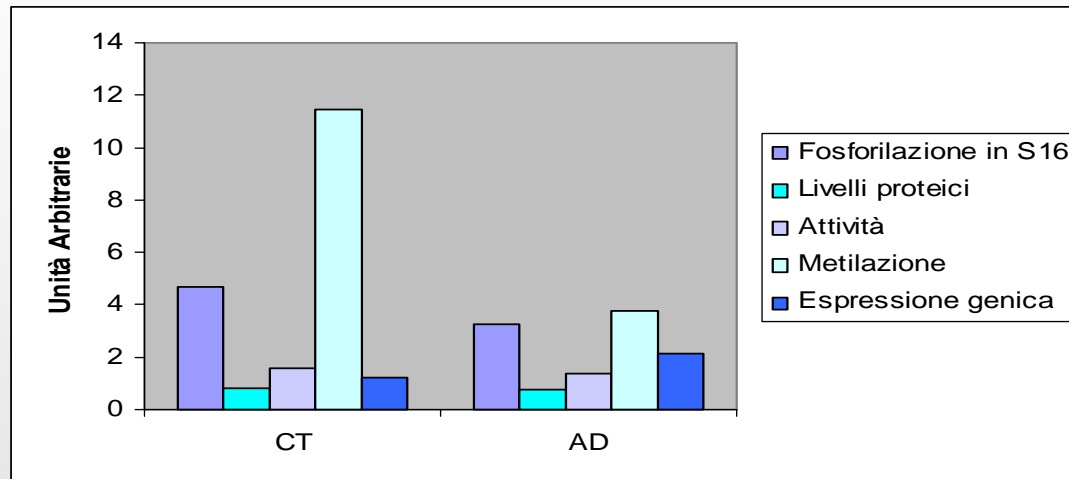
Risultati

	Fosforilazione in S16	Livelli proteici	Attività	Metilazione	Espressione genica
CT	4.68±0.49	0.85±0.07	1.58±0.24	11.45±2.26	1.22±0.14
AD	3.28±0.46	0.76±0.06	1.37±0.19	3.76±0.89	2.12±0.34
T test	p<0.05	n.s.	n.s.	p= 0.001	p<0.02



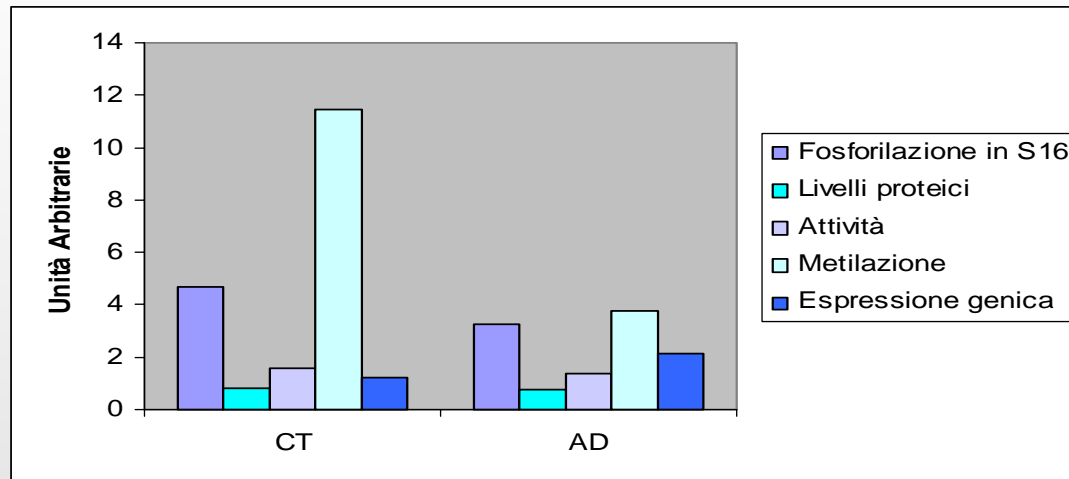
Risultati

	Fosforilazione in S16	Livelli proteici	Attività	Metilazione	Espressione genica
CT	4.68±0.49	0.85±0.07	1.58±0.24	11.45±2.26	1.22±0.14
AD	3.28±0.46	0.76±0.06	1.37±0.19	3.76±0.89	2.12±0.34
T test	p<0.05	n.s.	n.s.	p= 0.001	p<0.02



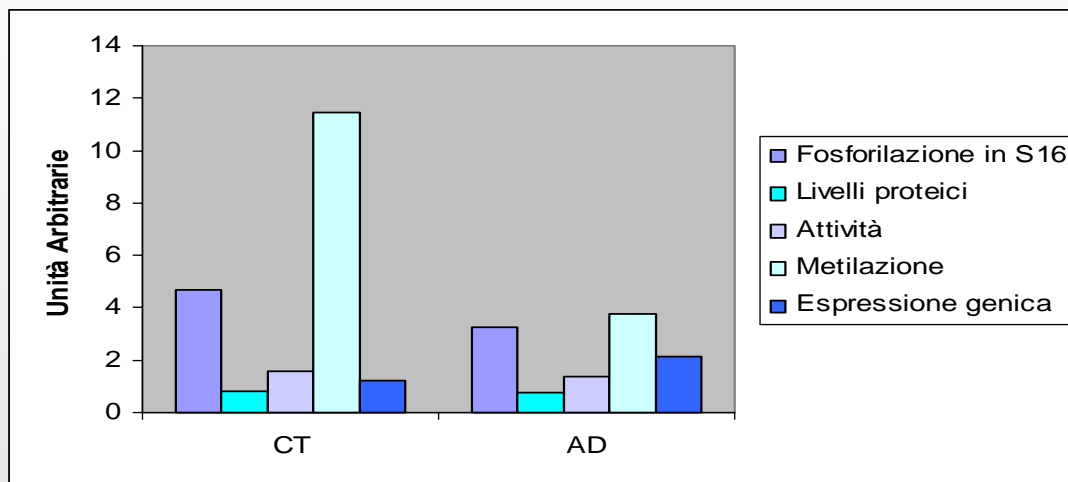
Risultati

	Fosforilazione in S16	Livelli proteici	Attività	Metilazione	Espressione genica
CT	4.68±0.49	0.85±0.07	1.58±0.24	11.45±2.26	1.22±0.14
AD	3.28±0.46	0.76±0.06	1.37±0.19	3.76±0.89	2.12±0.34
T test	p<0.05	n.s.	n.s.	p= 0.001	p<0.02

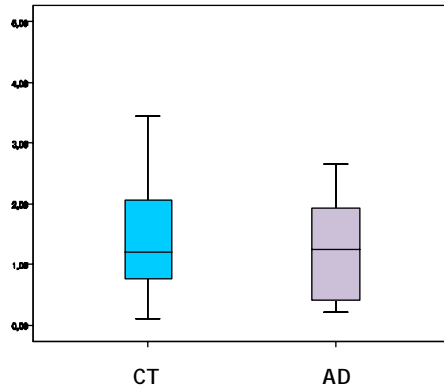


Risultati

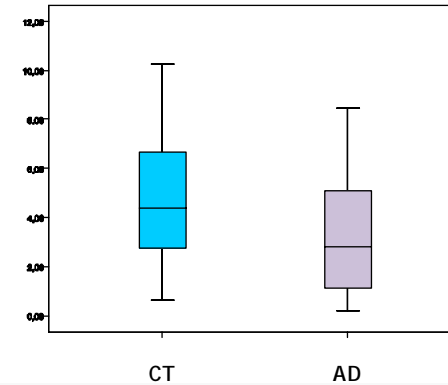
	Fosforilazione in S16	Livelli proteici	Attività	Metilazione	Espressione genica
CT	4.68±0.49	0.85±0.07	1.58±0.24	11.45±2.26	1.22±0.14
AD	3.28±0.46	0.76±0.06	1.37±0.19	3.76±0.89	2.12±0.34
T test	p<0.05	n.s.	n.s.	p= 0.001	p<0.02



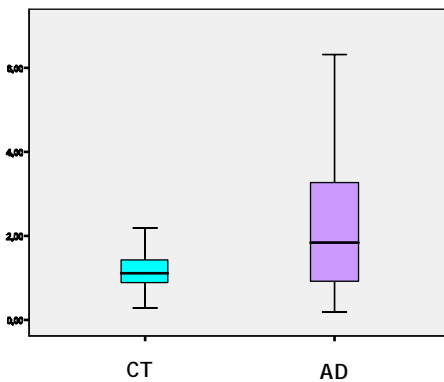
Attività



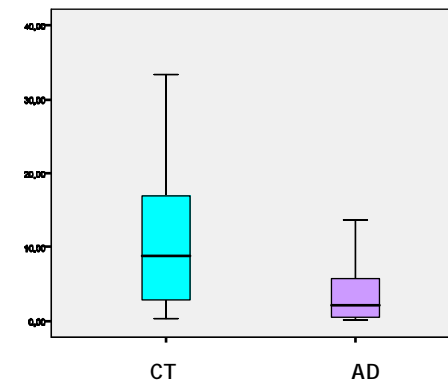
Fosforilazione in S16



Espressione genica



Metilazione



Polimorfismo -842 (G/C) di Pin1

	GG	GC
CT	92.3%	7.7%
AD	79.3%	20.7%

χ^2 p= 0.015

TOT	GG (83%)	GC (17%)
Fosforilazione in S16	3.87±0.36	3.68±0.65
Livelli proteici	0.84±0.05	0.77±0.08
Attività	1.48±0.16	1.60±0.49
Espressione genica	1.62±0.20	1.86±0.31
Metilazione	7.33±1.34	7.13±3.66

Polimorfismo -842 (G/C) di Pin1

	GG	GC
CT	92.3%	7.7%
AD	79.3%	20.7%

χ^2 p= 0.015

TOT	GG (83%)	GC (17%)
Fosforilazione in S16	3.87±0.36	3.68±0.65
Livelli proteici	0.84±0.05	0.77±0.08
Attività	1.48±0.16	1.60±0.49
Espressione genica	1.62±0.20	1.86±0.31
Metilazione	7.33±1.34	7.13±3.66

I CT portatori del genotipo GC mostrano:

- S16 ridotta (2.40±1.5 vs 4.99±0.51)
- Attività ridotta (0.68±0.52 vs 1.66±0.30)
- Metilazione aumentata (23.34±4.40 vs 10.71±2.36)

Isoforme di APOE

	$-\epsilon 4$	$\epsilon 4(1)$	$\epsilon 4(2)$
CT	84.6%	15.4%	0%
AD	48.3%	48.3%	3.4%

$\chi^2 p= 0.017$

TOT	$-\epsilon 4$	$\epsilon 4(1)$	$\epsilon 4(2)$
Fosforilazione in S16	4.07±0.41	3.97±0.69	1.62
Livelli proteici	0.86±0.06	0.69±0.07	1.16
Attività	1.40±0.18	1.62±0.31	1.25
Espressione genica	1.81±0.26	1.47±0.29	0.92
Metilazione	7.99±1.57	5.54±1.75	0.56

Isoforme di APOE

	$-\epsilon 4$	$\epsilon 4(1)$	$\epsilon 4(2)$
CT	84.6%	15.4%	0%
AD	48.3%	48.3%	3.4%

$\chi^2 p= 0.017$

TOT	$-\epsilon 4$	$\epsilon 4 (1)$	$\epsilon 4 (2)$
Fosforilazione in S16	4.07±0.41	3.97±0.69	1.62
Livelli proteici	0.86±0.06	0.69±0.07	1.16
Attività	1.40±0.18	1.62±0.31	1.25
Espressione genica	1.81±0.26	1.47±0.29	0.92
Metilazione	7.99±1.57	5.54±1.75	0.56

I CT portatori di almeno un allele $\epsilon 4$ mostrano:

- Espressione genica ridotta (0.81±0.28 vs 1.34±0.17)

Conclusioni

Questi risultati confermano il coinvolgimento di cellule periferiche nei processi neurodegenerativi

Supportano l'ipotesi di un coinvolgimento di Pin1 nei processi eziopatogenetici caratteristici di AD

L.Mastronardi, C.Gussago, C.Abbate, A.Casè,
L.Bergamaschini, C.Vergani. Università degli Studi di Milano

A. Bulbarelli, E. Lonati. Università Milano Bicocca

S.Bastias Candia, C. D'Addario, P.Romualdi. Università degli
Studi di Bologna