

Université de Montréal

**Caractérisation d'un désordre neurologique et musculaire  
chez les souris *dystonia musculorum***

par

Gratien Dalpé

**Programme de biologie moléculaire**

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en biologie moléculaire

Mars, 1998

Gratien Dalpé, 1998



Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Caractérisation d'un désordre neurologique et musculaire  
chez les souris *dystonia musculorum***

---

présentée par:

Gratien Dalpé

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Daniel Skup  
Président du jury

Rashmi Kothary  
Directeur de recherche

Richard Bertrand  
Membre du jury

René St-Arnaud  
Examineur externe (Hôpital Shriners)

Thèse acceptée le: <sup>20.07</sup> ~~18 juin~~ 1998

## Sommaire

Les souris *dystonia musculorum* (*dt*) sont atteintes d'une maladie neurodégénérative héréditaire affectant le système nerveux sensitif. Nous avons identifié le gène responsable de cette maladie et l'avons appelé *dystonine* (*Dst*). *Dst* est exprimé dans plusieurs tissus, particulièrement dans le système nerveux et les muscles.

Dystonine possède un domaine N-terminal de liaison à l'actine et un domaine C-terminal de liaison aux filaments intermédiaires. Ce domaine de liaison aux filaments d'actine permet à une protéine de fusion de s'associer à l'actine filamenteuse. Le domaine C-terminal permet l'association avec les filaments intermédiaires. Nous avons également démontré que l'actine filamenteuse est relocalisée vers les filaments intermédiaires dans des cellules surexprimant une mini-protéine de la dystonine contenant ces deux domaines. Ces données suggèrent que la dystonine est une protéine associée au cytosquelette pouvant former un pont entre les filaments intermédiaires et les filaments d'actine, et ainsi contribuer à l'organisation du cytosquelette.

Dans les neurones, la dystonine est localisée dans des compartiments cellulaires contenant les trois éléments du cytosquelette (microtubules, neurofilaments et actine): le corps cellulaire, les dendrites et l'axone. Toutefois, la dystonine n'est pas présente dans certains compartiments des neurones comme les synapses et les épines dendritiques; ces compartiments sont principalement composés d'actine filamenteuse. Des analyses ultrastructurales effectuées sur des axones *dt* des racines dorsales de la moelle épinière ainsi que sur des neurites *dt* générées en culture cellulaire, révèlent une désorganisation du cytosquelette. De façon surprenante, une désorganisation du réseau de microtubules a été également observée dans les neurones *dt*. Les quantités de MAP2 et de tau, des protéines associées aux microtubules, sont diminuées dans la moelle épinière des souris *dt*. À partir de ces résultats, nous concluons que la dystonine est essentiel au maintien de l'intégrité du cytosquelette neuronal.

*Dst* est aussi exprimé dans le muscle cardiaque et squelettique. Nous avons démontré que les souris *dt* sont atteintes d'une faiblesse musculaire et que l'architecture cellulaire des muscles squelettiques *dt* est instable. Des analyses ultrastructurales effectuées sur des myotubes *dt* ont révélé que la dystonine est responsable du maintien des disques Z et de l'organisation des myofibrilles. Les niveaux d'expression de la dystonine coïncident

avec ceux de la desmine durant la myogenèse et ces deux protéines sont co-localisées dans des cellules musculaires. Ces données indiquent que la dystonine est responsable du maintien de l'intégrité de l'architecture cellulaire des muscles squelettiques.

Collectivement, nos résultats suggèrent que la dystonine est une protéine qui sert de pont entre les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. Nos résultats indiquent qu'une mutation de la dystonine n'empêche pas la différenciation neuronale et musculaire. Toutefois, le rôle cellulaire de la dystonine serait davantage de maintenir l'intégrité de l'architecture cellulaire des neurones et des fibres musculaires.

## Table des matières

<b>Sommaire</b> .....	3
<b>Table des matières</b> .....	5
<b>Liste des figures et tableaux</b> .....	8
<b>Liste des abréviations</b> .....	10
<b>Remerciements</b> .....	12
<b>Chapitre 1 - Introduction</b> .....	13
1.0 <i>Dystonia musculorum</i> .....	16
2.0 Identification du gène <i>dystonine</i> .....	21
3.0 Cytosquelette .....	28
3.1 Microtubules .....	28
3.1.1 Assemblage des microtubules .....	29
3.1.2 Protéines associées aux microtubules (MAPs) .....	29
3.1.3 Organisation des microtubules .....	30
3.1.4 Rôle des microtubules dans le transport intracellulaire .....	31
3.2 Filaments intermédiaires (FIs) .....	32
3.2.1 Assemblage des filaments intermédiaires .....	32
3.2.2 Organisation des filaments intermédiaires .....	33
3.2.3 Les FIs ne sont pas essentiels à l'établissement de la morphologie cellulaire .....	35
3.2.4 Les FIs participent au maintien de l'intégrité cellulaire .....	35
3.3 Les microfilaments (MFs) .....	36
3.3.1 Assemblage des filaments d'actine .....	36
3.3.2 Localisation des microfilaments .....	37
3.4 Protéines pouvant lier les différents éléments du cytosquelette .....	39
3.4.1 Ponts fibreux entre les trois éléments du cytosquelette .....	39
3.4.2 Modèle de tensigrité .....	40
4.0 Cytosquelette et maladies humaines .....	40
4.1 Implication des microfilaments dans des maladies humaines .....	40
4.2 Pathologies impliquant les filaments intermédiaires .....	41
5.0 Hypothèse et objectifs de la thèse .....	42

<b>Chapitre 2 - Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization.....</b>	<b>44</b>
Abstract .....	45
Introduction.....	46
Results .....	48
Characterization of anti-dystonin antisera.....	48
<i>Dst</i> encodes a high molecular weight protein in the nervous system .....	49
Dystonin is distributed throughout the nervous system .....	49
The cytoskeleton is disorganized in the DRG neurons of <i>dt</i> mice.....	50
Dystonin is co-localized with the neuronal cytoskeleton .....	51
Microtubule associated proteins are affected in <i>dt</i> spinal cord neurons.....	52
Discussion .....	54
Experimental Methods.....	58
Acknowledgments .....	62
References .....	62
<b>Chapitre 3 - Dystonin deficient mice exhibit an intrinsic muscle weakness and an instability of skeletal muscle cytoarchitecture.....</b>	<b>82</b>
Summary.....	83
Introduction.....	83
Materials and methods.....	85
Results .....	90
Skeletal muscles from <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> mice are weak and fragile.....	90
Ultrastructural abnormalities in <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> skeletal muscle.....	91
Muscle development is normal in <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> skeletal muscle .....	92
Abnormal cytoarchitecture in <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> myotube cultures.....	93
Dystonin has a functional actin binding domain.....	93
Dystonin C-terminal domain associates with intermediate filaments.....	94
A dystonin mini-gene relocates actin filaments towards IFs .....	94
<i>Dst</i> is expressed in skeletal muscle .....	95
Dystonin expression coincides with desmin during myogenesis.....	97
Discussion .....	97
Acknowledgments.....	103

References .....	104
<b>Chapitre 4 - Discussion</b> .....	128
La dystonine est une protéine qui peut former un pont entre les filaments intermédiaires et les filaments d'actine .....	129
Un rôle pour la dystonine dans le maintien du cytosquelette neuronale .....	133
Un rôle pour la dystonine dans le maintien de l'intégrité de l'architecture des muscles squelettiques.....	139
La dystonine comme organisateur des filaments intermédiaires.....	144
La dystonine comme stabilisateur des filaments d'actine.....	147
La dystonine participerait à l'organisation spatiale de l'actine F et des filaments intermédiaires.....	149
La dystonine comme intégrateur du cytosquelette.....	149
 <b>Annexe 1.</b> La dystonine est une protéine conservée au cours de l'évolution .....	151
Le clonage d'un homologue de la dystonine chez le poulet.....	151
La dystonine de poulet possède une structure homologue à celle de la souris et de l'humain.....	152
 <b>Annexe 2.</b> La dystonine s'associe progressivement au cytosquelette .....	161
 <b>Annexe 3.</b> Déstabilisation de l'actine corticale des cellules de Schwann <i>dt<sup>Tg4</sup></i> .....	165
 <b>Références</b> .....	172

## Liste des figures et tableaux

### Chapitre 1

<b>Figure 1:</b> Une souris <i>dystonia musculorum</i> .....	14
<b>Figure 2:</b> Schéma représentant la structure des protéines Bpag1 et dystonine .....	27
<b>Tableau 1:</b> Les différentes sous-unités composant les filaments intermédiaires et leur expression selon le type cellulaire .....	32

### Chapitre 2

<b>Figure 1.</b> Schematic representation of the protein structures of Bpag1 and the neural isoforms of dystonin .....	68
<b>Figure 2.</b> Abnormal <i>Dst</i> transcripts in four different <i>dt</i> mutants .....	69
<b>Figure 3.</b> Immunoblot analysis of dystonin .....	70
<b>Figure 4.</b> Specificity of the 10C5 mAb and the gpAC1 Ab in immunohistochemical analysis .....	72
<b>Figure 5.</b> Dystonin is widely distributed in the nervous system .....	74
<b>Figure 6.</b> The <i>dt</i> neuronal cytoskeleton is disorganized .....	76
<b>Figure 7.</b> <i>dt</i> DRG explants are capable of neurite outgrowth but the cytoskeleton within the neurites is perturbed .....	78
<b>Figure 8.</b> Subcellular localization of dystonin in adult rat spinal cord neurons .....	79
<b>Figure 9.</b> Levels of MAP2 and tau are altered in <i>dt/dt</i> spinal cord neurons .....	81

### Chapitre 3

<b>Figure 1.</b> Measurement of diaphragm contractility and of sarcolemmal damage in <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> mice .....	114
<b>Figure 2.</b> Cytoarchitectural disruption in <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> skeletal muscle .....	115
<b>Figure 3.</b> Normal levels of myogenin and desmin mRNA in <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> muscle ..	117
<b>Figure 4.</b> Disorganized cytoarchitecture in <i>dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup></i> cultured myotubes .....	118
<b>Figure 5.</b> GFP-ABD and GFP-IFAD associate with actin and intermediate filaments respectively .....	119



<b>Figure 6.</b> A GFP-tagged dystonin mini-protein (GFP-linker) displaces actin stress fibers to the IF network .....	121
<b>Figure 7.</b> Expression of two <i>Dst</i> isoforms in skeletal muscle and myogenic cell lines .....	123
<b>Figure 8.</b> Immunoblot analysis of dystonin in muscle cells .....	125
<b>Figure 9.</b> Dystonin is expressed during myogenesis and in adult skeletal muscle fibers .....	126

## Chapitre 4

<b>Figure 1:</b> Schéma représentant la fonction de la dystonine dans la phase de maintien du cytosquelette neuronal .....	138
<b>Figure 2.</b> Rôle de la dystonine dans les fibres musculaires .....	143
<b>Figure 3.</b> Schéma représentant les différents mécanismes utilisés par Bpag1 et par la dystonine afin d'ancrer les filaments intermédiaires .....	146

## Annexe 1

<b>Figure 1.</b> La séquence nucléotidique partielle et le polypeptide prédit de l'isoforme 1 de <i>Dst</i> chez le poulet .....	153
<b>Figure 2.</b> La séquence de la dystonine de poulet est très conservée au cours de l'évolution .....	157

## Annexe 2

<b>Figure 1.</b> Association de la dystonine au cytosquelette des myoblastes .....	161
<b>Figure 2.</b> Expression progressive de la dystonine dans les neurones .....	162

## Annexe 3

<b>Figure 1.</b> Immortalisation de cellules de Schwann <i>dt<sup>Tg4</sup></i> .....	165
<b>Figure 2.</b> Un défaut de l'actine corticale existe dans les cellules de Schwann <i>dt<sup>Tg4</sup></i> .....	166
<b>Figure 3.</b> La surexpression du domaine de liaison à l'actine (ABD) de la dystonine protège l'actine filamenteuse .....	168

## Liste des abréviations

ABP	protéine liant l'actine
ABD	domaine de liaison à l'actine
actine F	actine filamenteuse
actine G	actine monomérique
ADN	acide déoxyribonucléique
ADN-c	acide déoxyribonucléique complémentaire
ALS	sclérose latérale amyotrophique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ATP	adénosine triphosphate
Bpag1	bullous pemphigoid antigen 1
<i>Bpag1</i> <sup>-/-</sup>	ablation génétique du gène Bpag1 murin
<i>BPAG1</i>	gène BPAG1 humain
<i>Bpag1</i>	gène Bpag1 murin
Ca <sup>2+</sup>	calcium
COMT	centre organisateur des microtubules
C-terminal	carboxy-terminal
<i>desmine</i> <sup>-/-</sup>	ablation génétique du gène desmine murin
DMD	dystrophie musculaire de Duchenne
<i>dt</i>	<i>dystonia musculorum</i>
<i>dt/dt,NFH-lacz</i>	homozygotes <i>dt</i> exprimant la protéine NFH-lacz
<i>Dst</i>	gène de la dystonine murin
<i>DST</i>	gène de la dystonine humain
FI	filament intermédiaire
<i>Gapdh</i>	gène de la glyceraldehyde-3-phosphate déhydrogenase
GFAP	protéine fibrillaire gliale acide
GFP	protéine verte fluorescente
hsp68	heat shock protein 68
<i>hsp68-lacz</i>	promoteur hsp68 exprimant le gène lacz
IFAP	protéine associée aux filaments intermédiaires
IFAD	domaine d'association aux filaments intermédiaire
kb	kilobase
kD	kiloDalton
<i>lacz</i>	gène beta-galactosidase
MAP	protéine associée aux microtubules
MF	microfilament d'actine
Mg <sup>2+</sup>	magnésium
ms	milliseconde
MT	microtubule
NF	neurofilament
NFH	sous-unité de 210 kD des neurofilaments
NFH-lacz	protéine de fusion entre NFH et lacz
NFL	sous-unité de 70 kD des neurofilaments

NFM	sous-unité de 160 kD des neurofilaments
nm	nanomètre
N-terminal	amino-terminal
pb	paire de base
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
<i>plectine</i> <sup>-/-</sup>	ablation génétique du gène plectine murin
<i>Pmp22</i>	gène de la pmp22 murin
RACE	amplification rapide d'extrémité d'ADN-c
RT-PCR	amplification PCR sur de l'ADN-c
SER	réticulum endoplasmique lisse
Sf9	cellules d'insectes <i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>SOD1</i>	gène de la superoxide dismutase 1 humain
<i>tsa58</i>	mutation thermosensible dans l'antigène grand T de SV40
μm	micromètre
UPGMA	unweighted pair group method with arithmetic mean

## Remerciements

Je veux avant tout à remercier mon directeur de doctorat, le Dr. Rashmi Kothary. La confiance et la grande liberté d'action que m'a donné le Dr. Kothary ont été une source de stimulation qui m'a permis d'apporter une vision personnelle à cette recherche. Je voudrais le remercier pour avoir su m'insufflé le goût du questionnement et du sens critique. Je tiens également à remercier le Dr. Nicole Leclerc pour sa grande générosité et qui, au travers de nos collaborations et de nos discussions, a contribué grandement à ma formation.

Je tiens à remercier sincèrement ma compagne Christine Girard qui m'a appuyé pendant ces quelques années. Je te remercie pour la très grande patience dont tu as fait preuve. Je remercie également mes parents pour le support qu'il m'ont apporté durant toute mes études.

Je voudrais finalement remercier tous ceux que j'ai côtoyé et qui m'ont de près ou de loin, aider au cours des ces années. D'abord et avant tout, merci à Martine Mathieu et à Yves de Repentigny pour tout ce qu'il m'ont enseigné et leur participation directe à mon projet. Merci à nos collaborateurs "musclés" soit Alain Comtois, Ercheng Zhu et Norman Comtois. Merci également à tous les autres soit, Stéphan Denis, Louis-Georges Guy, Nathalie Delvoye, Arthur Brown, Sylvia Wasiak, Martin Houle, Gilbert Bernier, André Toulouse, Miguel Landers, Anne-Marie Mes-Masson, Michela Bossolasco, Francis Rodier, Louise Champoux, Andrée Lemyre, Lee Wall, Ted Bradley, Dan Skup, Pierre Chartrand, Marie-José Dicaire et Roxane Lussier. Merci à Benoit Houle pour avoir lu et commenté ma thèse. Merci aux photographes du service de l'audio-visuel, Luc Lauzière et les autres, pour leurs conseils et les nombreuses photos qu'ils ont développées.

## **Chapitre 1 - Introduction**

**Figure 1:** Une souris *dystonia musculorum*



L'étude d'une maladie héréditaire chez la souris est d'une très grande utilité pour la compréhension des processus pathogéniques en cause. Avec ce modèle animal, il est possible d'étudier l'apparition des premières anomalies histopathologiques durant le développement embryonnaire jusqu'à la culmination des symptômes aux derniers stades de la maladie. L'identification du gène muté dans une maladie héréditaire donne directement accès à la nature des mécanismes moléculaires initiant la pathologie. Le travail présenté dans cette thèse de doctorat se veut la caractérisation de la fonction du gène muté chez les souris *dystonia musculorum* (*dt*).

## 1.0 *Dystonia musculorum*

*Dystonia musculorum* (*dt*) est une maladie neurodégénérative héréditaire de la souris (Duchen et al., 1963; Duchén and Strich, 1964). Cette maladie, initialement décrite par Duchén, fut nommée ainsi en raison des mouvements anormaux de ces souris qui semblaient dus à une perte de tonus musculaire (Duchen and Strich, 1964). Cette maladie récessive héréditaire est transmise par un autosome. Les hétérozygotes *dt* ont une apparence normale, mais 25% des souriceaux issus du croisement de deux parents hétérozygotes développent la maladie (Duchen and Strich, 1964). Le phénotype de ces souris, qui apparaît normalement entre 7 et 15 jours après la naissance, est caractérisé par une incoordination des membres et par une posture anormale du tronc et des membres (Duchen et al., 1963; Duchén and Strich, 1964). Ce phénotype peut être facilement visualisé en tenant une souris *dt* suspendue par la queue; un homozygote pour un allèle *dt* fléchit ses membres contre son corps alors qu'une souris de type sauvage déploie ses membres. À mesure que les souris *dt* vieillissent, les mouvements des membres sont progressivement ataxiques et ces souris deviennent alors incapables de marcher. Il n'y a pas de paralysie apparente chez les souris *dt*, mais ces souris semblent être affectées par une faiblesse musculaire. Des homozygotes *dt* sont généralement plus petits que des souris normales (Duchen and Strich, 1964). Les souris *dt* ne survivent pas passé la période de la maturité



sexuelle. Toutefois, certaines souris ont survécu jusqu'à une période de 8 mois, ce qui suggère que la mutation *dt* n'est pas létale *a priori*.

Des analyses histopathologiques ont révélé que le syndrome neurodégénératif affecte de façon sélective la partie sensitive du système nerveux. Chez les plus jeunes souris *dt*, la neurodégénérescence est caractérisée par la présence de gonflements axonaux périodiques ainsi que par de la fibrose dans les fibres nerveuses. Les gonflements sont localisés dans la partie proximale et distale de l'axone et peuvent atteindre un diamètre de 40  $\mu\text{m}$  (Duchen and Strich, 1964). Chez les plus vieilles souris *dt*, une réduction marquée du nombre de fibres nerveuses ainsi qu'une perte de la couche de myéline ont été observées. Les signes de neurodégénérescence sont présents dans les racines dorsales ainsi que dans les ganglions des racines dorsales de la moelle épinière. Les fibres sensitives spinothalamiques et spinocérébelleuses sont également affectées (Al-Ali and Al-Zuhar, 1989; Duchen and Strich, 1964; Janota, 1972; Sotelo and Guenet, 1988). Ces anomalies histologiques sont retrouvées dans les racines sensitives des nerfs crâniens V, VII, IX et X mais pas dans les nerfs crâniens I, II et VIII (Duchen and Strich, 1964). La densité en fibres nerveuses provenant de la peau, des corpuscules pileux, des moustaches, des dents, des ongles et des articulations, est considérablement réduite chez les souris *dt* (Duchen and Strich, 1964). Les corpuscules de Pacini, qui sont normalement innervés par une fibre nerveuse unique, sont dépourvus d'innervation chez les souris *dt* (Duchen and Strich, 1964). Les fuseaux musculaires sont réduits en nombre et sont atrophiés, même chez les plus jeunes souris *dt* (Duchen and Strich, 1964).

Au début du phénotype *dt*, l'innervation motrice semble normale. Les racines ventrales de la moelle épinière contiennent des fibres nerveuses intactes qui sont normalement myélinisées (Duchen and Strich, 1964). Toutefois, des signes de dénervation musculaire partielle ont été observés chez des souris *dt* maintenues en vie pour plus d'un

mois. Ces signes étaient accompagnés par la mise en évidence de fibres nerveuses motrices innervant plusieurs fibres musculaires, contrairement à la situation normale où une fibre motrice unique innerve une seule fibre musculaire (Duchen and Strich, 1964). Ce phénomène de branchement multiple des fibres nerveuses motrices est observé dans les cas de dénervation partielle et a été interprété comme une réinnervation par les fibres nerveuses survivantes (Duchen and Strich, 1964). Le système nerveux sympathique, composé de neurones moteurs localisés en dehors de système nerveux central, est également épargné par la neurodégénérescence (Duchen and Strich, 1964). Malgré la présence de quelques gonflements axonaux dans la couche de cellules granulaires du cervelet ainsi que dans le cortex cérébral, aucune malformation n'a été identifiée dans le cerveau des souris *dt* (Duchen and Strich, 1964). Toutes ces observations suggèrent que le phénotype *dt* affecte de façon spécifique les fibres afférentes du système nerveux (Duchen and Strich, 1964; Sotelo and Guenet, 1988). Ces données suggèrent que le phénotype d'incoordination des membres chez les souris *dt* est causé par une perte d'innervation des voies sensibles et des propriocepteurs tels que les fuseaux musculaires et les corpuscules de Pacini (Duchen and Strich, 1964).

Des études ultrastructurales ont démontré que la neurodégénérescence des neurones sensitifs *dt* est initialement caractérisée par des gonflements axonaux contenant des organelles, des mitochondries, des corps membranaires denses et des accumulations de neurofilaments (NFs) (Al-Ali and Al-Zuhar, 1989; Duchen, 1976; Hanker and Peach, 1976; Janota, 1972; Sotelo and Guenet, 1988). Ces anomalies structurales ont également été observées chez des souris *dt* âgées de 4 jours (P4) (Janota, 1972), suggérant que la pathologie serait initiée avant l'apparition du phénotype. Des caractéristiques communes avec les neurones chromatolytiques ont été observées dans les neurones sensitifs secondaires de la moelle épinière ainsi que dans les neurones des ganglions des racines dorsales des souris *dt*. Les corps cellulaires de ces neurones contiennent des noyaux

eccentriques, une fragmentation du réticulum endoplasmique granulaire et une densité accrue des NFs (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964; Sotelo and Guenet, 1988). Une autre étude a démontré qu'il y a une phosphorylation anormale des NFs ainsi qu'une accumulation de ceux-ci dans l'espace périakial et dans la portion proximale des axones des neurones de la moelle épinière chez les souris *dt* (Campbell and Peterson, 1992). Cette étude indique que les propriétés biochimiques des NFs sont modifiées dans les neurones *dt*. Il existe une très bonne corrélation entre la neurodégénérescence et le calibre des axones ciblés. La dégénérescence axonale est exclusivement observée dans les axones myélinisés de grand et moyen calibre (Sotelo and Guenet, 1988). Ces axones contiennent une densité élevée de NFs, ce qui suggère l'implication des NFs dans le développement de la maladie.

Il a été démontré que l'expression d'une protéine de fusion *NFH-lacZ* chez des souris transgéniques cause l'agrégation des NFs dans le corps cellulaire des neurones et prévient le transport de ceux-ci dans l'axone (Eyer and Peterson, 1994). Cette condition n'influence pas le développement du système nerveux chez la souris. Afin de déterminer si les NFs participent à la progression du phénotype *dt*, des souris *NFH-lacZ* ont été croisées avec des souris *dt* dans le but d'obtenir des souris *NFH-lacZ, dt/dt*. À l'aide de cette expérience, il a été démontré que le phénotype *dt* persiste dans les racines dorsales de ces souris, mais que son apparition est retardée (Eyer et al., 1998). Ces données suggèrent que la présence des NFs dans l'axone accélère la progression du phénotype chez les souris *dt*. Toutefois, l'expérience réalisée dans cette étude indique que l'absence des NFs dans l'axone ne suffit pas à empêcher le développement de la maladie. Chez les souris *NFH-lacZ, dt/dt*, il y a une agrégation massive de NFs dans le corps cellulaire, et il est possible que cette accumulation puisse initier la pathologie *dt*. Une approche plus directe pour évaluer le rôle joué par les NFs serait de croiser les souris *dt* avec les souris *NFL<sup>-/-</sup>*.

Certaines études suggèrent que les cellules de Schwann soient affectées par la mutation *dt*. Une démyélinisation autour des gonflements axonaux ainsi que la présence de débris de myéline dans les cellules de Schwann suggèrent qu'il y a un processus de démyélinisation secondaire à la dégénérescence axonale chez les souris *dt* (Duchen, 1976; Hanker and Peach, 1976; Janota, 1972). Toutefois, de la démyélinisation a été observée autour d'axones ne présentant pas de signes de dégénérescence, suggérant alors l'existence d'un défaut intrinsèque aux cellules de Schwann chez les souris *dt* (Moss, 1981a; Moss, 1981b). Ce défaut de myélinisation a aussi été observé avant l'apparition des gonflements axonaux, suggérant à ces auteurs que la dégénérescence axonale pourrait être causée par une démyélinisation massive des axones (Moss, 1981b). Lors d'expériences de greffe de cellules de Schwann *dt* dans des souris hôtes normales, Moss a remarqué un défaut de myélinisation causant des gonflements axonaux aux neurones des souris hôtes (Moss, 1981a). Cependant, il a été démontré chez des souris chimères *dt/dt*  $\leftrightarrow$  *+/+*, que la dégénérescence axonale n'est observée que dans des axones de génotype *dt/dt*, indépendamment du génotype des cellules de Schwann (Campbell and Peterson, 1992). Ces expériences établissent clairement que la neurodégénérescence est causée par un défaut intrinsèque aux neurones *dt*. Il est également possible que les cellules de Schwann soient affectées par la mutation *dt*, mais la participation d'un défaut de myélinisation dans le processus de dégénérescence axonale reste incertaine à ce stade.

Ces observations permettent de spéculer sur la fonction possible du gène muté chez les souris *dt*. Plusieurs auteurs ont noté que le développement du système nerveux semble se faire de façon normale jusqu'à la naissance (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964; Janota, 1972). Les neurones qui dégèrent chez les souris *dt* sont tous liés à la partie sensitive du système nerveux. Ces données suggèrent que le gène muté chez les souris *dt* est responsable de la survie des neurones sensitifs. Il est possible que ce gène soit impliqué dans le transport axonal, car le processus de dégénérescence semble être initié dans

l'axone, par l'accumulation d'organelles et de NFs dans des gonflements (Al-Ali and Al-Zuhar, 1989; Hanker and Peach, 1976; Janota, 1972). Ces gonflements axonaux étant observés avant l'apparition du phénotype chez les souris *dt*, il est vraisemblable que ce phénomène puisse initier la mort de l'axone par une interruption du transport axonal (Al-Ali and Al-Zuhar, 1989; Hanker and Peach, 1976; Janota, 1972). Toutefois, la fonction du produit du gène *dt* n'étant pas connue, l'étiologie de ces phénomènes histopathologiques demeure incertaine.

## 2.0 Identification du gène *dystonine*

La lignée de souris transgénique Tg4, contient de 15 à 20 copies d'un transgène *hsp68-lacZ* intégrées en un seul concatémère, dans une orientation tête à queue (Kothary et al., 1988). Le transgène *hsp68-lacZ* était spécifiquement exprimé dans le système nerveux durant le développement embryonnaire. Lorsque des hémizygotés Tg4/+ ont été croisés ensemble, les homozygotés de la génération suivante ont commencé à montrer des signes d'incoordination des membres. Les souris affectées ont progressivement perdu la coordination de leurs membres et sont mortes avant la maturité sexuelle (Kothary et al., 1988). Ce phénotype était très similaire à celui des souris *dt* (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964). Une expérience de complémentation, effectuée avec des hétérozygotés *dt* et des hémizygotés Tg4/-, a confirmé que le mutant insertionnel Tg4 et *dt* sont alléliques (Kothary et al., 1988).

Les souris *dt*<sup>Tg4</sup> ont permis le clonage positionnel du gène *dt*. Les séquences flanquantes à l'intégration du transgène ont été clonées et ont servi de sondes pour le clonage, par marche chromosomique, de 75 kb d'ADN génomique au locus *dt*. Plusieurs sondes à l'intérieur de cette région ont été utilisées pour caractériser l'insertion du transgène chez les souris *dt*<sup>Tg4</sup>. Une délétion de 45 kb d'ADN génomique est le seul réarrangement qui ait été identifié suite à l'insertion du transgène *hsp68-lacZ* chez les souris *dt*<sup>Tg4</sup> (Brown

et al., 1994a). Le site d'intégration du transgène a été cartographié sur la partie proximale du chromosome 1 de la souris, à proximité du gène *Bpag1*. Cette région du chromosome 1 de la souris est synténique avec les régions 6p11-12 et 2q chez l'humain (Brown et al., 1994a). Au locus *dt* de la souris, un fragment d'ADN génomique conservé chez plusieurs espèces a servi de sonde pour le clonage du locus *DT* humain. Le locus *DT* a été localisé au chromosome 6p12, qui est également la localisation chromosomique du gène *BPAG1* humain (Brown et al., 1994b; Sawamura et al., 1990). Toutefois, aucune maladie neurodégénérative n'a été cartographiée à la localisation 6p12.

Au locus *dt* de souris, des fragments d'ADN génomique phlogéniquement conservés ont été identifiés. Un de ces fragments contenait un exon candidat de 90 pb, tel qu'identifié par le programme d'analyse de séquence GRAIL (Brown et al., 1995a). Cette séquence de 90 pb avait la propriété de protéger de l'ARNm extrait de cerveau et de moelle épinière dans des analyses de protection contre la ribonucléase (Brown et al., 1995a). Cette séquence permettait également la détection d'un ARNm dans les ganglions des racines dorsales de la moelle épinière, tel que détecté par hybridation *in situ* (Brown et al., 1995a). La séquence de cet exon candidat a été utilisée dans une procédure de RT-PCR, nommée RACE, afin d'amplifier un ADN-c contenant cet exon candidat. De plus grands fragments d'ADN-c ont ainsi été obtenus et ont servi de sondes pour le criblage de banques d'ADN-c fabriquées à partir du cerveau et de la moelle épinière. Deux transcrits ont été identifiés dans le système nerveux de la souris (Brown et al., 1995a). Ce gène candidat, contenant des séquences faisant partie de la délétion d'ADN génomique des souris *dt<sup>Tg4</sup>*, fut nommé *dystonine (Dst)*.

Les deux transcrits du gène *Dst* diffèrent à leurs extrémité 5', par la présence de deux exons (A et A') qui sont alternativement exprimés dans le système nerveux (Figure 2). Ces exons sont contenus dans la région délétée chez les souris *dt<sup>Tg4</sup>*. À l'exception de

ces deux exons alternatifs, le reste de la séquence de ces deux transcrits de 15 kb est identique. Un isoforme de *Dst*, caractérisé par un transcrit de ~18 kb, est exprimé dans le muscle cardiaque (Bernier et al., 1995; Bernier et al., 1996). Des recherches informatisées ont été effectuées dans des banques de données (BLAST), en utilisant la séquence polypeptidique codée par l'ADN-c. Ces recherches ont permis l'identification d'une très grande homologie entre la région N-terminale de la protéine dystonine et le domaine de liaison à l'actine (ABD) d'un très grand nombre de protéines, telles que la dystrophine, la spectrine  $\beta$  et l'actinine  $\alpha$  (Brown et al., 1995a). De ces analyses, il a aussi été démontré que la portion C-terminale de la dystonine est quasiment identique avec la séquence de la protéine humaine BPAG1, commençant précisément à partir de l'exon 2 de *BPAG1* (Brown et al., 1995a). Les gènes *BPAG1* et *Dst* sont cartographiés à la même localisation chromosomique chez l'humain et la souris. Ainsi, en plus d'être liés génétiquement, les gènes *Dst* et *BPAG1* font partie du même domaine transcriptionnel.

*Bpag1* est un autoantigène associé à la pemphigoïde bulleuse, une dermatose bulleuse acquise chronique caractérisée par une séparation sous-épidermique de la jonction dermo-épidermique (Mueller et al., 1989; Peyron et al., 1995; Stanley et al., 1981). Ces autoanticorps ciblant *Bpag1* ont servi au clonage de l'ADN-c codant pour cette protéine (Sawamura et al., 1991; Sawamura et al., 1990; Stanley et al., 1988). La séquence de la protéine *Bpag1* est contenue dans un transcrit épithélial de 9 kb qui ne contient pas l'ABD présent dans la dystonine. *Bpag1* a été localisé sur le disque interne des hémidesmosomes des kératinocytes basaux (Mutasim et al., 1985; Westgate et al., 1985). Ces jonctions ont pour fonction d'ancrer les cellules de la couche squameuse de l'épiderme sur la matrice extracellulaire située à la frontière entre le derme et l'épiderme. *Bpag1* fait partie d'une famille de protéines s'associant aux FIs. Cette famille de protéine comprend la plectine, desmoplakine, envoplakine, plakoglobine et IFAP300 (Green et al., 1992; Ruhrberg et al., 1996; Skalli et al., 1994; Stappenbeck et al., 1993; Wiche et al., 1993). Ces protéines

partagent, en leur extrémité C-terminale, une séquence répétée qui semble être responsable de l'association aux FIs (Green et al., 1992). Le domaine C-terminal de la plectine peut s'associer *in vivo* avec les FIs de cellules épithéliales (Wiche et al., 1993). Toutes ces données suggèrent que *Bpag1* participe à l'ancrage des filaments de kératine dans les hémidesmosomes. L'ablation génétique du gène *Bpag1* chez la souris résulte en une perte d'intégrité des cellules épithéliales, causée par la dissociation des filaments de kératine des hémidesmosomes (Guo et al., 1995). En plus d'être atteintes d'un affaiblissement des cellules épithéliales, ces souris sont affectées d'un syndrome neurologique identique à *dystonia musculorum* (Guo et al., 1995). Un test de complémentation entre les souris *Bpag1*<sup>-/-</sup> et *dt* a démontré que ces deux mutations sont alléliques (Guo et al., 1995).

Le gène *Dst* est altéré chez des mutants spontanés *dt*. Des analyses de protection contre la ribonucléase ont révélé une réduction de 3 fois des niveaux d'ARNm des deux isoformes *Dst* dans le système nerveux des souris *dt*<sup>24J</sup> (Bernier et al., 1995). Des analyses par buvardage Northern ont permis la détection d'une bande supplémentaire de taille inférieure à celle de 15 kb chez les souris *dt*<sup>24J</sup> (Bernier et al., 1995; Brown et al., 1995a). D'autres analyses par buvardage Northern ont également démontré une réduction significative des niveaux d'ARNm de *Dst* dans le système nerveux des souris *dt*<sup>27J</sup> (Figure 2, chapitre 2). Les souris *dt*<sup>Alb</sup> ont subi une délétion de tout le gène *Bpag1* et conséquemment, l'ARNm de *Dst* n'est pas détecté dans le système nerveux de ces souris en utilisant une sonde d'ADN-c correspondant à ces séquences délétées (Brown et al., 1995a). Ces analyses démontrent clairement que *Dst* est altéré chez quatre lignées de souris *dt* (*dt*<sup>Tg4</sup>, *dt*<sup>24J</sup>, *dt*<sup>27J</sup>, *dt*<sup>Alb</sup>), et ce au niveau de l'ARNm ainsi que de l'ADN génomique codant pour ces transcrits.

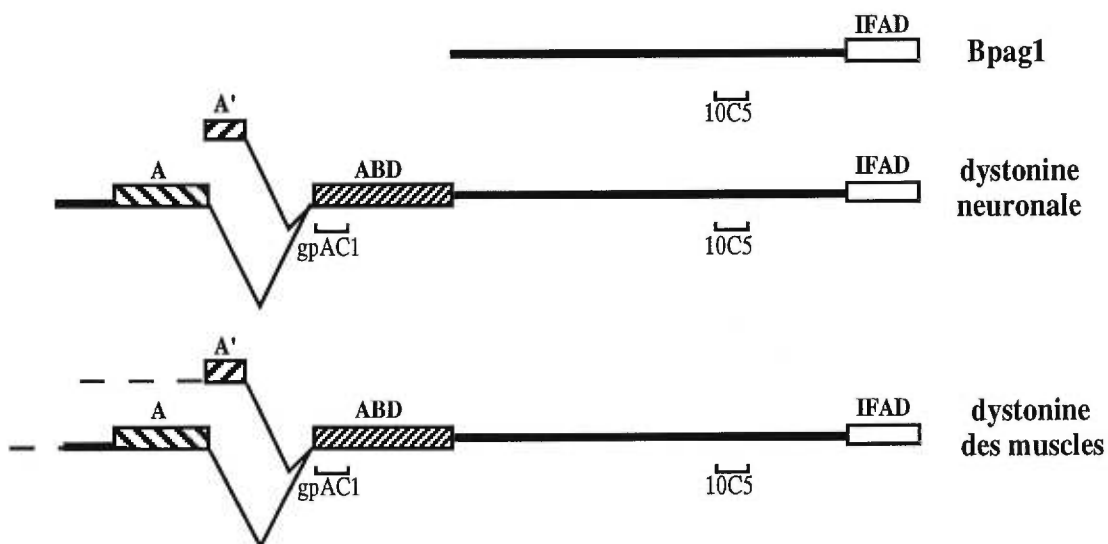
Malgré l'apparition postnatale du phénotype *dt*, le gène *Dst* est exprimé dans le système nerveux durant le développement embryonnaire (Bernier et al., 1995; Dowling et al., 1997). Durant l'embryogenèse, l'expression de *Dst* prédomine dans les neurones étant



le plus affectés par la neurodégénérescence, soit ceux des ganglions des racines dorsales de la moelle épinière ainsi que ceux des ganglions crâniens (Bernier et al., 1995). Ces observations suggèrent que la neurodégénérescence postnatale est le résultat d'un processus progressif commençant durant l'embryogenèse. Des niveaux d'expression semblables d'ARNm de *Dst* sont observés entre les neurones moteurs et les neurones sensitifs, quoique le processus dégénératif affecte de façon sélective les neurones de la partie sensitive du système nerveux (Bernier et al., 1995). Ces observations permettent d'exclure l'hypothèse selon laquelle la vulnérabilité sélective face au processus dégénératif est due à une expression exclusive de *Dst* dans les neurones sensitifs. *Dst* est exprimé à des niveaux semblables parmi tous les neurones des ganglions spinaux et crâniens, n'expliquant pas la nature sélective de la dégénérescence des neurones avec des axones à grand calibre (Bernier et al., 1995). Il est possible que le processus dégénératif affecte sélectivement les neurones possédant un très grand volume axoplasmique, tel que ceux avec des axones à gros calibre. Le stress cellulaire serait, selon ce modèle, plus important dans les neurones possédant un très grand volume axoplasmique. Il est intéressant de noter que les neurones du ganglion du nerf crânien 8 expriment *Dst* mais ne montrent pas de signes de dégénérescence (Bernier et al., 1995). Cependant, le nerf crânien 8 est très court, et possède donc un volume axoplasmique réduit (Wilson-Pauwels et al., 1988).

La séquence primaire de la dystonine prédit une protéine rigide de très grande taille qui pourrait être un pont entre différents éléments du cytosquelette, soit *a priori*, entre les microfilaments (MFs) d'actine et les FIs (Brown et al., 1995a). Les études histopathologiques effectuées chez les souris *dt* pointent vers une perturbation des NFs dans l'axone. *Dst* est exprimé, au niveau de l'ARNm, dans plusieurs types de neurones, qu'il soit ou non affectés par la neurodégénérescence. Il existe néanmoins une très bonne corrélation, et ce au niveau des neurones sensitifs, entre la présence de la neurodégénérescence et l'abondance des NFs dans l'axone durant le développement

neuronal. Ces observations permettent de suggérer que la dystonine est une protéine associée au cytosquelette qui participerait à l'élaboration du cytosquelette neuronal, ou qui pourrait tout au moins, contribuer à son maintien. La perte de fonction d'une protéine comme la dystonine pourrait résulter en une désorganisation du cytosquelette axonal, et de ce fait, perturber la survie du neurone.



**Figure 2:** Schéma représentant la structure des protéines Bpag1 et dystonine. ABD, domaine de liaison à l'actine; IFAD, domaine s'associant aux filaments intermédiaires; A et A', domaines codés par les exons alternatifs qui sont délétés chez les souris *dt<sup>Tg4</sup>*. La position relative des épitopes des anticorps caractérisés dans ce travail, gpAC1 et de 10C5, est indiquée sur le schéma. Les lignes pointillées, sur le schéma de la dystonine des muscles, représentent des séquences inconnues.

### 3.0 Cytosquelette

Le cytosquelette est composé de protéines polymérisées formant des filaments. Trois classes de filaments, chacune caractérisée par des protéines distinctes et par un diamètre défini, ont été décrites dans la cellule: les MFs avec un diamètre de 5-7 nm, les filaments intermédiaires (FIs) avec un diamètre de 10 nm et les microtubules (MTs) avec un diamètre de 25 nm (Wolfe, 1993).

Le cytosquelette constitue la base solide de tous les types cellulaires. L'emplacement du noyau, du réticulum endoplasmique, des organelles, et des membranes dépend de l'association de ces structures avec le cytosquelette (Wolfe, 1993). À cause de cette association avec les différentes composantes de la cellule, le cytosquelette est également directement impliqué dans une très grande variété de processus cellulaires tel que la division cellulaire, la sécrétion, l'endocytose, le transport intracellulaire d'organelles et la motilité cellulaire (Wolfe, 1993). Le cytosquelette procurerait également une protection à la cellule face à des stress physiques de l'environnement (Wolfe, 1993).

#### 3.1 Microtubules

Les MTs sont essentiellement assemblés à partir d'une protéine nommée tubuline. Il existe deux types de tubuline, soit la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , qui s'associent sous forme d'hétérodimère (Wolfe, 1993). Les hétérodimères  $\alpha\beta$  peuvent s'assembler en protofilaments formant un feuillet cylindrique qu'on nomme un MT. Dans la cellule, il existe un équilibre entre les MTs assemblés et une réserve d'hétérodimères de tubuline soluble, ce qui permet à la cellule d'assembler et de désassembler les MTs à différentes étapes du cycle cellulaire (Wolfe, 1993).

### 3.1.1 Assemblage des microtubules

Les MTs sont généralement assemblés à partir d'un centre organisateur des MTs (COMT) qui porte le nom de centrosome dans les cellules de mammifères. Les centrosomes sont normalement localisés en périphérie du noyau et sont responsables de l'organisation des MTs dans les cellules animales durant et après la division cellulaire (Ault and Rieder, 1994; Joshi, 1994). Le COMT contient un autre type de tubuline, la tubuline  $\gamma$ , qui servirait de centre de nucléation et qui favoriserait la polymérisation des hétérodimères de tubuline  $\alpha\beta$  (Moritz et al., 1995; Shu and Joshi, 1995). Les MTs sont des filaments polaires, car une des extrémités des MTs possède la propriété d'assembler et de désassembler les hétérodimères de tubuline à une vitesse beaucoup plus grande que l'autre extrémité (Kirschner, 1980). Cette extrémité où il y a un assemblage et un désassemblage rapide est appelée l'extrémité + alors que l'autre extrémité est appelée l'extrémité -. Les MTs sont assemblés avec leur extrémité - associée au COMT alors que l'extrémité + est orientée vers l'extérieur.

Deux facteurs importants contrôlent l'équilibre entre les hétérodimères de tubuline et les MTs: la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  et les protéines associées au MTs (microtubule associated protein ou MAP). De très faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  pousse l'équilibre vers l'assemblage des MTs (Schliwa, 1976; Weisenberg, 1972). Ce système de régulation rapide par le  $\text{Ca}^{2+}$  procure à la cellule une façon très rapide de contrôler l'assemblage des MTs.

### 3.1.2 Protéines associées aux microtubules (MAPs)

Les MAPs contribuent à stabiliser les MTs en s'associant aux hétérodimères de tubuline. Lorsqu'intégrés aux MTs, les MAPs stabilisent les MTs et empêchent leur désassemblage (Bulinski and Borisy, 1980; Sloboda et al., 1976). Il existe plusieurs MAPs

qui sont soit ubiquitaires ou soit exprimées spécifiquement dans certains tissus. Par exemple, la protéine MAP4 est présente dans plusieurs types cellulaires chez les mammifères. Cependant, d'autres MAPs comme tau et MAP2, sont présents dans le système nerveux seulement (Mandelkow and Mandelkow, 1995). L'activité des MAPs est contrôlée par la phosphorylation de ceux-ci. L'ajout de groupements phosphate sur les MAPs contribue à diminuer leur action stabilisante envers les MTs (Jameson and Caplow, 1981).

Les MAPs ont été considérablement étudiés dans les neurones. MAP1A et MAP1B sont localisés dans tous les compartiments cellulaires des neurones, soit le corps cellulaire, les dendrites et l'axone (Hirokawa, 1994). Par contre, MAP2A et 2B ne sont localisés que dans les dendrites (Kosik and Finch, 1987), alors que tau est spécifiquement localisé dans l'axone (Binder et al., 1985; Kosik and Finch, 1987). Durant la différenciation neuronale, MAP1B et MAP2C, considérés comme les MAPs juvéniles, sont exprimés très tôt lors de l'induction neuronale. Ces MAPs sont par la suite remplacés par les MAPs adultes, soit MAP1A et MAP2A/B (Tanaka et al., 1992).

### **3.1.3 Organisation des microtubules**

Dans la plupart des types cellulaires, les MTs sont associés au COMT à la périphérie cellulaire (Joshi, 1994). Toutefois, les MTs des neurones sont très abondants dans l'axone et les dendrites, des compartiments qui sont très éloignés des COMTs du corps cellulaire. Dans les neurones, les COMTs ne sont pas présents dans l'axone et les dendrites (Lyser, 1968), suggérant que les MTs doivent être transportés dans l'axone et les dendrites. Les MTs de l'axone sont organisés en faisceaux parallèles au grand axe de l'axone, et sont orientés avec leur extrémité + vers les synapses (Heidemann et al., 1981). Dans les dendrites, les MTs sont aussi organisés en faisceaux mais l'orientation polarisée des MTs n'est pas constante (Hirokawa, 1994). Des fibroblastes transfectés avec les ADN-

c codant pour tau et MAP2 contiennent des MTs arrangés en faisceaux, comme ceux des neurones (Lee and Rook, 1992; Weisshaar et al., 1992). Lorsque des cellules Sf9 sont infectées avec un baculovirus recombinant surexprimant les protéines tau ou MAP2, ces cellules acquièrent des filopodes multiples contenant des MTs organisés en faisceaux (Baas et al., 1991; Chen et al., 1992). À l'intérieur de ces filopodes, l'espacement entre les MTs varie selon la protéine exprimée. Ces expériences suggèrent que l'espacement caractéristique entre les MTs de l'axone et des dendrites est en partie dû à la protéine MAP exprimée dans ces compartiments neuronaux. Ces observations suggèrent que l'organisation des MTs, induite par les MAPs, contribue à la morphologie neuronale.

#### **3.1.4 Rôle des microtubules dans le transport intracellulaire**

Les MTs étant des filaments polaires, ils peuvent servir de route de transport à des molécules motrices se déplaçant spécifiquement vers l'extrémité + ou - de ces filaments. Ces molécules motrices sont connues sous le nom de kinésine (déplacement vers l'extrémité +) et dynéine (vers l'extrémité -). Dans l'axone des neurones, la kinésine et la dynéine permettent le transport antérograde et rétrograde d'organelles (Amaratunga et al., 1993; Ferreira et al., 1992; Gilbert and Sloboda, 1989; Schnapp and Reese, 1989). La polarité des MTs est aussi très importante dans le cas de la division cellulaire. Les chromosomes nouvellement dupliqués sont séparés et transportés vers les centrioles situés aux deux pôles de la cellule en mitose, en utilisant le fuseau mitotique bâti à partir des MTs (Ault and Rieder, 1994). Les MTs sont également importants dans le trafic d'organelles comme le réticulum endoplasmique, le Golgi, les endosomes et les lysosomes (Cole and Lippincott-Schwartz, 1995).

Le réseau de MTs servirait durant le développement embryonnaire. Les MTs pourraient spécifier la polarité de l'embryon en servant de route pour la localisation spécifique d'ARNm. Ce système permettrait à certaines protéines d'être localisées de façon

asymétrique dans l'embryon. Le transcrit de *Xcat-2* est relocalisé à différents endroits durant la maturation l'oocyte de *Xenopus* et ce, via le réseau de MTs (Zhou and King, 1996). Durant le développement de la drosophile, la localisation spécifique de transcrits (ex. *nanos*) vers un pôle particulier de l'embryon semble dépendre des MTs (Micklem, 1995).

### 3.2 Filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires (FIs) sont appelés ainsi à cause de leur diamètre intermédiaire en comparaison avec l'actine F et les MTs. Les protéines qui sont assemblées en FIs ont une distribution tissulaire qui leur est spécifique (tableau 1).

**Tableau 1:** Les différentes sous-unités composant les filaments intermédiaires et leur expression selon le type cellulaire (Lazarides, 1980; Wolfe, 1993)

<u>Sous-unité des filaments intermédiaires</u>	<u>Spécificité cellulaire</u>
kératines (cytokératines de types I et II)	cellules épithéliales
vimentine	cellules d'origine mésenchymateuse
desmine	muscle cardiaque, lisse et squelettique
protéine fibrillaire gliale acide (GFAP)	cellules gliales
neurofilaments (NFL, NFM, NFH)	neurones
lamines (A, B, C)	le noyau de toutes les cellules eucaryotes

#### 3.2.1 Assemblage des filaments intermédiaires

Les séquences des différentes sous-unités des FIs révèlent que ces protéines possèdent plusieurs caractéristiques communes. Toutes ces protéines possèdent un domaine central composé de 4 segments d'hélices  $\alpha$  (Heins and Aebi, 1994). Il existe une



très grande homologie à l'intérieur de cette famille de protéines, au niveau du domaine central. Aux extrémités de cette région centrale existent deux domaines globulaires dont la séquence et la longueur varient parmi les sous-unités des FIs (Heins and Aebi, 1994).

Certaines sous-unités des FIs, tel la vimentine et la desmine, peuvent être assemblées sous forme d'homopolymères (Steinert et al., 1981). D'autres sous-unités, les cytokératines I et II et les NFs, sont des hétéropolymères obligatoires (Eichner et al., 1986; Lee et al., 1993). Les sous-unités des FIs ont la propriété de s'assembler spontanément *in vitro* et *in vivo* (Heins and Aebi, 1994). Par exemple, les cytokératine I et II forment un hétérodimère parallèle en hélices torsadées. Par la suite, deux hétérodimères s'associent de façon antiparallèle en un tétramère (Heins and Aebi, 1994). Les tétramères sont ensuite alignés bout à bout pour former de longs filaments nommés les protofilaments (Heins and Aebi, 1994). Les extrémités globulaires serviraient à contrôler l'assemblage des FIs (Herrmann et al., 1992; Hofmann and Herrmann, 1992; McCormick et al., 1993). Par exemple, les lamines sont phosphorylées à l'extrémité N-terminale juste avant leur désassemblage de l'enveloppe nucléaire durant la division cellulaire (Chou et al., 1996; Moir and Goldman, 1993). Les lamines perdent leurs groupements phosphate à la fin de la division cellulaire lorsqu'elles sont réassemblées (Chou et al., 1996; Moir and Goldman, 1993).

### **3.2.2 Organisation des filaments intermédiaires**

Dans plusieurs types cellulaires, les FIs sont distribués en un réseau contenu dans le cytoplasme et concentré autour du noyau (Lazarides, 1980). Ce réseau est composé de filaments courbés et enchevêtrés, qui sont parfois regroupés en faisceaux. Dans les cellules possédant des desmosomes (jonction intercellulaire) ou des hémidesmosome (jonction cellule-matrice extracellulaire), on peut observer des FIs ancrés dans ces jonctions (Lazarides, 1980). Certains types cellulaires, tels les neurones et les muscles, possèdent

une morphologie cellulaire particulière. Les FIs de ces cellules ont également une organisation particulière. Dans les neurones, les NFs sont présents dans le corps cellulaire, les dendrites et l'axone (Hirokawa et al., 1984). L'axone est le compartiment du neurone où l'on retrouve une très grande densité de neurorilaments, soit 10 fois plus que le nombre de MTs. La distribution des sous-unités NFH et NFM varie entre l'axone et les dendrites. Le rapport NFH/NFM est plus grand dans l'axone que dans les dendrites (Hirokawa et al., 1984). Les NFs sont orientés de façon parallèle au grand axe de l'axone avec un espacement égal entre chacun des filaments (Hirokawa et al., 1984). De petites extensions perpendiculaires sont observées tout le long des NFs. Ces extensions sont composées de la portion C-terminale des polypeptides NFM et NFH (Hirokawa et al., 1984). Ces domaines de NFM/NFH sont amplement phosphorylés dans l'axone (Julien and Mushynski, 1983; Julien and Mushynski, 1982; Pant et al., 1978; Shecket and Lasek, 1982). Le niveau de phosphorylation de NFH serait responsable de l'espacement entre les NFs et par conséquent du calibre axonal (de Waegh et al., 1992). Dans les muscles squelettiques, les filaments de desmine sont en association avec la périphérie des disques Z des myofibrilles où ils forment un réseau perpendiculaire au grand axe de la fibre musculaire (Lazarides, 1980). Dans le muscle lisse et cardiaque, les filaments de desmine sont respectivement associés avec les plaques cytoplasmiques et les disques intercalaires, des structures équivalentes aux disques Z dans ces types de muscles (Lazarides, 1980; Tokuyasu et al., 1983a; Wolfe, 1993).

La composition des FIs dans les neurones et les muscles change au cours du développement. Dans les neurones embryonnaires, l'interneurine  $\alpha$  est exprimée avec NFL et NFM (Fliegner et al., 1990; Julien et al., 1986; Kaplan et al., 1990). À la naissance, l'expression l'interneurine  $\alpha$  diminue alors que celle des trois sous-unités des NFs augmente (Fliegner et al., 1990; Julien et al., 1986; Kaplan et al., 1990). Dans le muscle squelettique, la nestine et la vimentine sont les principales sous-unités des FIs des

myoblastes (Gard and Lazarides, 1980; Kachinsky et al., 1994). Lors de la fusion des myoblastes en myotubes, la desmine devient alors la plus abondante sous-unité des FIs (Gard and Lazarides, 1980).

### **3.2.3 Les FIs ne sont pas essentiels à l'établissement de la morphologie cellulaire**

Quoique les FIs forment un réseau occupant tout le cytoplasme, il ne sont pas essentiels à l'établissement de la morphologie cellulaire. Par exemple, l'injection de fibroblastes avec un anticorps anti-vimentine provoque l'affaissement du réseau de FIs vers la périphérie nucléaire. Cependant, cette perte des FIs n'affecte en rien l'organisation des MFs, des MTs, et la morphologie cellulaire (Lin and Feramisco, 1981). Les FIs ne sont également pas essentiels à la différenciation de myoblastes en myotubes contractiles. La transfection d'un gène recombinant codant pour une protéine de desmine tronquée provoque l'affaissement du réseau de FIs dans les myoblastes (Schultheiss et al., 1991). Ces myoblastes sont toutefois capables de fusionner en myotubes et de former des myofibrilles (Schultheiss et al., 1991). Une mutation du gène *NFL* chez la caille empêche la formation du réseau de NFs, sans empêcher le développement neuronal (Mizutani et al., 1992; Yamasaki et al., 1992; Yamasaki et al., 1991). Cette observation a également été faite chez les souris transgéniques *NFH-lacZ*, dont les neurones sont exempts de NFs dans l'axone (Eyer and Peterson, 1994).

### **3.2.4 Les FIs participent au maintien de l'intégrité cellulaire**

Des mutations ponctuelles dans le gène kératine 14 peuvent causer l'agrégation et l'affaissement du réseau de kératine dans des cultures cellulaires de kératinocytes (Coulombe et al., 1991) ainsi que dans l'épiderme de souris transgénique (Vassar et al., 1991). Ces souris transgéniques sont affectées de symptômes observés dans une maladie

humaine appelée l'épidermose bulleuse simple. La moindre pression mécanique sur la peau de ces souris, par exemple l'allaitement, cause le déchirement de la peau. Des analyses microscopiques ont démontré la présence de lésions au niveau des cellules de la couche basale de l'épiderme. De façon analogue, des fibroblastes obtenus de souris ayant subi l'ablation génétique du gène *vimentine* sont plus fragiles face à des stress mécaniques induits en culture cellulaire (Goldman et al., 1996). Toutes ces observations suggèrent que les FIs ne seraient pas essentiels durant le développement et la différenciation, mais qu'ils participeraient au maintien de l'intégrité cellulaire.

### 3.3 Les microfilaments (MFs)

Les MFs sont assemblés à partir d'une protéine soluble qu'on nomme l'actine. L'actine soluble disponible dans la cellule est nommée l'actine G alors que l'actine assemblée en filaments est nommée l'actine F ou MFs. Chez les mammifères, il existe plusieurs isotypes d'actine G: toutes les cellules possèdent l'actine  $\beta$  et  $\gamma$  et les muscles possèdent en plus l'actine  $\alpha$  (Wolfe, 1993). L'actine  $\alpha$  est une constituante des myofibrilles et sert, en association avec la myosine, à la contraction musculaire (Wolfe, 1993). Il existe un type spécialisé d'actine  $\alpha$  selon le type de muscle: l'actine  $\alpha_c$ , l'actine  $\alpha_{sm}$  et l'actine  $\alpha_{sk}$  sont respectivement présentes dans le muscle cardiaque, lisse et squelettique (Wolfe, 1993).

#### 3.3.1 Assemblage des filaments d'actine

Il existe un équilibre entre l'actine G et l'actine F qui peut être influencé par plusieurs paramètres, dont la concentration en  $Mg^{2+}$  et en ATP, et la présence de protéines liant l'actine (ABP). L'actine G est assemblée en deux chaînes linéaires superenroulées formant des filaments de longueurs variables. Ces filaments possèdent une polarité biochimique relative à la vitesse d'assemblage et de désassemblage à chacune des

extrémités du filament (Kirschner, 1980). Relativement aux concentrations d'actine G, la vitesse d'assemblage et de désassemblage à l'extrémité + est beaucoup plus grande que celle à l'extrémité - (Kirschner, 1980). Les conditions cellulaires balancent l'équilibre vers l'assemblage en actine F (Wolfe, 1993). Contrairement à la situation des MTs, où les MAPs balancent l'équilibre vers la polymérisation de la tubuline, les ABPs contrebalancent l'équilibre envers l'actine G. Une des stratégies utilisées pour empêcher l'assemblage d'actine F est de lier l'actine G à une ABP, bloquant ainsi sa disponibilité dans la cellule. La plus connue de ces ABPs liant l'actine G est la profiline (Carlsson et al., 1977; Markey et al., 1978). D'autres ABPs maintiennent l'équilibre vers l'actine G en se liant aux extrémités des filaments, particulièrement à l'extrémité +, dans le but d'empêcher l'addition de monomère d'actine G. Ces ABPs sont appelées les protéines de coiffage et une de celles-ci est la fragmine (Hasegawa et al., 1980; Sugino and Hatano, 1982). D'autres ABPs telle que la villine et la gelsoline, appelées les protéines de fragmentation, coupent et coiffent les longs filaments d'actine (Bretscher and Weber, 1979; Craig and Powell, 1980; Yin and Stossel, 1979; Yin et al., 1980). Ces fractures introduites dans l'actine F permettent de réguler la longueur des filaments et de désassembler rapidement le réseau.

### 3.3.2 Localisation des microfilaments

Les MFs sont localisés dans plusieurs compartiments cellulaires où il sont parfois organisés en un réseau de filaments enchevêtrés ou en faisceaux qu'on appelle fibres de tension. Plusieurs ABPs sont responsables de la localisation et de l'organisation spécifique des MFs dans la cellule.

Dans plusieurs types cellulaires, l'espace en dessous de la membrane plasmique, le cortex cellulaire, est plus rigide que les régions plus internes du cytoplasme. La rigidité du cortex cellulaire dépend de la présence de MFs réticulés par des ABPs, telle la filamine et la cortexiline (Faix et al., 1996; Mimura and Asano, 1979; Wang and Singer, 1977). Certains

processus cellulaires, comme la sécrétion, nécessitent le démantèlement de ce réseau de MFs cortical. Les protéines de fragmentation gelsoline et scindhérine sont activées lors des processus de sécrétion et d'exocytose, permettant le démantèlement du réseau d'actine cortical (Borovikov et al., 1995; Zhang et al., 1996).

Afin de maintenir en place la membrane plasmique, certaines cellules sont liées à la matrice extracellulaire par des récepteurs transmembranaires. Un de ces récepteurs, celui de la fibronectine, lie la fibronectine qui est associée au collagène de la matrice extracellulaire. À l'intérieur de la cellule, la partie cytoplasmique de ce récepteur est associée à un complexe de protéines comprenant la taline, la vinculine et l'actinine  $\alpha$  (Chen et al., 1985). L'actinine  $\alpha$  est une ABP qui ancre les MFs dans ces jonctions liant la matrice extracellulaire (Chen et al., 1985). Ces jonctions transmembranaires contribuent à stabiliser la membrane plasmique et à maintenir en position les cellules dans le tissu.

Dans plusieurs types cellulaires, l'actine est impliquée dans la production d'un mouvement. Un des meilleurs exemples est la contraction générée par l'association de l'actine et de la myosine dans les myofibrilles des fibres musculaires (Wolfe, 1993). La myosine est une molécule motrice se déplaçant sur l'actine-F des myofibrilles (Wolfe, 1993). Ce déplacement de la myosine sur l'actine crée un mouvement contractile de la fibre musculaire. Dans l'axone des neurones, l'actine-F sert également de route de transport aux mitochondries. Des études, dans lesquelles les MFs ont été sélectivement dépolymérisés à l'aide de la cytochalasine b, ont démontré la participation de l'actine F dans le transport rétrograde des mitochondries axonales (Morris and Hollenbeck, 1995). Chez les souris *dilute*, le réticulum endoplasmique lisse (SER) des cellules de Purkinje n'est pas transporté dans les dendrites (Takagishi et al., 1996). Le gène affecté chez ces souris code pour une myosine qui participerait au transport du SER sur l'actine F (Mercer et al., 1991).

### **3.4 Protéines pouvant lier les différents éléments du cytosquelette**

#### **3.4.1 Ponts fibreux entre les trois éléments du cytosquelette**

Au début des années 1980, les premières études sur le cytosquelette ont démontré la présence de structures ou de ponts fibreux entre les différents éléments du cytosquelette (Wolosewick and Porter, 1979). Ces ponts fibreux forment un réseau, appelé le réseau microtrabéculaire, qui occupe tout le cytoplasme et dans lequel on retrouve les organelles de la cellule (Ellisman and Porter, 1980; Wolosewick and Porter, 1979). Des préparations de cytosquelette obtenues à l'aide de la technique de cryodécapage ont permis de caractériser la composition et l'organisation spatiale du cytosquelette. Les MFs, les filaments intermédiaires et les MTs forment des contacts entre eux, et ce à plusieurs endroits. Des ponts fibreux, observés à ces jonctions, seraient responsables d'une certaine cohésion entre les éléments du cytosquelette (Heuser and Kirschner, 1980; Hirokawa, 1982).

Des études d'immunolocalisation effectuées à l'aide de la microscopie électronique ont permis l'identification de certains éléments formant le réseau microtrabéculaire. Les protéines MAP1 et 2 sont des protéines fibreuses formant des ponts entre les MTs (Hirokawa et al., 1985). La sous-unité NFH des NFs est la principale protéine fibreuse faisant des ponts entre les NFs (Hirokawa et al., 1984). Des évidences biochimiques suggèrent également que des protéines associées à un élément du cytosquelette puissent aussi se lier à d'autres éléments. Un exemple est la protéine tau, qui en plus de faire partie de la famille des MAPs peut également lier l'actine. La protéine MAP2 s'associe avec les trois éléments du cytosquelette (Bloom and Vallee, 1983).

### **3.4.2 Modèle de tensigrité**

Une cohésion du cytosquelette est observée dans des expériences où l'on mesure la tension et l'intégrité d'une cellule. Des expériences où l'on applique une force de torsion sur le cytosquelette révèlent que la cellule offre une résistance proportionnelle à la force appliquée (Wang et al., 1993). Lorsque l'actine-F de ces cellules est dépolymérisée à l'aide de la cytochalasine b, cette résistance diminue de 50%. La dépolymérisation conjointe des MFs et des MTs, ou des MFs et des FIs, élimine totalement la résistance des cellules (Wang et al., 1993). Ces observations suggèrent que les différents éléments du cytosquelette sont intégrés en une seule unité et que l'intégrité d'une cellule pourrait dépendre de la tension de son cytosquelette. Ce modèle de tension-intégrité, ou de tensigrité, apporterait à la cellule une plus grande résistance que l'action isolée des différents éléments du cytosquelette.

## **4.0 Cytosquelette et maladies humaines**

### **4.1 Implication des microfilaments dans des maladies humaines**

Le cytosquelette, particulièrement les MFs, est affecté dans certaines pathologies humaines. Les niveaux de certaines ABPs diminuent dans les cellules néoplasiques (Chaponnier and Gabbiani, 1989; Vandekerckhove et al., 1990). Une diminution des protéines associées aux points de contact, soit l'actinine  $\alpha$  et la vinculine, a été également observée dans des cellules 3T3 transformées par le virus SV40 (Gluck et al., 1993; Sadano et al., 1992). La surexpression de la vinculine et de l'actinine  $\alpha$  dans ces cellules réverte le phénotype de transformation (Gluck et al., 1993; Rodriguez Fernandez et al., 1992). Ces études suggèrent qu'il existe un lien entre la grande motilité des cellules métastatiques et la diminution des niveaux des ABPs faisant partie des points de contact. Le gène responsable de la neurofibromatose de type 2, une maladie où les cellules de Schwann deviennent



tumorales, code pour la protéine merline (Trofatter et al., 1993). Cette protéine a la capacité de lier les MFs et la membrane plasmique. Cette étude indique qu'une mutation de cette ABP et la perturbation des MFs initierait le processus de tumorigenèse.

Une diminution de la résistance de la membranes plasmique est une caractéristique communes à certaines maladies héréditaires. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie caractérisée par la dégénérescence progressive du muscle cardiaque et squelettique. La DMD est le résultat d'une mutation dans un gène qui code pour une très grande protéine, appelée la dystrophine (Hoffman et al., 1987). Cette protéine est localisée sur la face cytoplasmique du sarcolemme dans le muscle cardiaque et squelettique (Ahn and Kunkel, 1993). La DYSTROPHINE lie les MFs à un complexe de protéines transmembranaires nommé dystroglycan. Les dystroglycans sont à leur tour associés à la laminine-2 de la lamina basale (Campbell, 1995; Ervasti and Campbell, 1993). Donc, la dystrophine peut établir un pont entre les MFs cytoplasmiques et la matrice extracellulaire. Dans des muscles dystrophiques, ce type de lien n'existe plus et les fibres musculaires ne résistent pas au stress mécanique infligé au sarcolemme durant la contraction (Pasternak et al., 1995; Petrof et al., 1993). L'anémie hémolytique est une autre maladie héréditaire dans laquelle la membrane plasmique des érythrocytes a perdu sa résistance. Plusieurs mutations dans les gènes codant pour la protéine membranaire spectrine, la protéines 4.1 et 4.2, affaiblissent la rigidité de la membrane plasmique en brisant le lien avec les MFs (Delaunay, 1995).

#### **4.2 Pathologies impliquant les filaments intermédiaires**

En plus de l'épidermolyse bulleuse simplex causée par des mutation dans les gènes *kératine 5* et *14*, d'autres maladies sont causées par l'accumulation anormale de FIs. Dans le système nerveux, l'accumulation et la désorganisation des NFs est une caractéristique commune à plusieurs maladies neurodégénérative et autres formes d'intoxications

chimiques (Bizzi et al., 1984; Goldman and Yen, 1986). Dans des maladies comme l'atrophie musculaire spinale (Byers and Banker, 1961) et la sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Carpenter, 1968), l'accumulation anormale de NFs est observée dans des gonflements axonaux et cette anomalie corrèle avec une diminution du transport axonal et la neurodégénérescence (Delisle and Carpenter, 1984; Hirano, 1991; Hirano et al., 1984). L'étiologie de cette maladie est inconnue excepté pour 20% des cas où une mutation du gène *SOD1* a été identifiée (Rosen, 1993). Cependant, des études effectuées sur des souris transgéniques surexprimant une des sous-unités des NFs définissent un rôle aux NFs dans l'initiation de la neurodégénérescence.

Ainsi, des souris transgéniques surexprimant NFL de souris (Xu et al., 1993), NFM (Wong et al., 1995) et NFH humain (Coté et al., 1993) ou une forme mutante de NFL humain (Lee et al., 1994) sont atteintes à divers degrés, de dégénérescence des neurones moteurs. Ces phénotypes sont similaires à ce qui est observé chez les patients atteints d'ALS. Les neurones moteurs de ces souris contiennent des gonflements axonaux et des NFs accumulés dans l'espace perikaryal et dans la partie proximale de l'axone, suggérant que l'accumulation des NFs peut initier le processus de neurodégénérescence. Le mécanisme moléculaire altérant les propriétés des NFs chez ces souris demeure inconnu.

## 5.0 Hypothèse et objectifs de la thèse

Basé sur la structure primaire de la dystonine et sur les caractéristiques histopathologiques des neurones sensitifs des souris *dt*, nous avons émis l'hypothèse que la dystonine est une protéine servant de pont entre les MFs et les filaments intermédiaires. Ces ponts consolideraient les FIs et les MFs dans l'axone des neurones sensitifs. La dystonine pourrait fonctionner de façon similaire dans les muscles squelettiques où elle pourrait ancrer les filaments de desmine dans des structures riches en MFs, soit le sarcolemme et les disques Z.

Les objectifs de ce travail sont premièrement de générer des anticorps spécifiques ciblant un épitope de la dystonine (en N-terminal). Ces anticorps vont nous permettre de déterminer la localisation intracellulaire de la dystonine dans le système nerveux et dans les muscles de la souris. Des culture cellulaires de neurones et de myoblastes seront également utilisées à cette fin.

Nous voulons de plus caractériser les transcrits et la protéine du gène *Dst* chez différents allèles *dt* afin de mieux comprendre la nature de ces mutations et de la pathogénèse. Nous voulons poursuivre cette études en caractérisant, à l'aide de cultures primaires de tissus, les neurones et les muscles de souris *dt*. Cette caractérisation devraient nous renseigner sur les défauts intrinsèques aux neurones et aux muscles *dt*. Nous allons particulièrement déterminer s'il y désorganisation du cytosquelette neuronal et musculaire chez les souris *dt*.

Nous voulons cloner et séquencer les homologues de *Dst* chez l'humain et le poulet afin de déterminer si ce gène a été conservé au cours de l'évolution. Avec ces séquences, nous allons comparer l'ABD et l'IFAD de la dystonine à ceux d'autres protéines homologues. Nous voulons également déterminer si l'ABD et l'IFAD sont fonctionnels *in vivo*. Pour ce faire, nous voulons transfecter des ADN-c exprimant des protéines chimériques contenant ces domaines fusionnés à une protéine fluorescente (GFP). La localisation intracellulaire de ces protéines de fusion fluorescentes nous renseignera sur l'activité de ces domaines *in vivo*. En utilisant une stratégie similaire, nous voulons reconstruire une protéine dystonine et l'introduire dans des cultures cellulaires. L'objectif de cette expérience est de déterminer si cette protéine est un véritable pont, *in vivo*, entre les MFs et les filaments intermédiaires.

## **Chapitre 2 - Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization**

Gratien Dalpé<sup>\*</sup>, Nicole Leclerc<sup>†</sup>, Annie Vallée<sup>†</sup>, Anne Messer<sup>‡</sup>, Martine Mathieu<sup>\*</sup>, Yves De Repentigny<sup>\*</sup>, and Rashmi Kothary<sup>\*,<sup>‡</sup>,1</sup>

<sup>\*</sup>Institut du cancer de Montréal, Centre de recherche du CHUM, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

<sup>†</sup>Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

<sup>‡</sup>Wadsworth Center/David Axelrod Institute, New York State Department of Health, Albany, N.Y. 12201, U.S.A.

<sup>1</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Manuscrit accepté pour publication dans

Molecular and Cellular Neuroscience

1998

**Abstract**

The mouse neurological mutant *dystonia musculorum* (*dt*) suffers from a hereditary sensory neuropathy. We have previously described cloning and characterization of the *dt* gene which we named dystonin (*Dst*). We had shown that dystonin is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1 (Bpag1) with an N-terminal actin binding domain. It has been shown before that dystonin is a cytoskeletal linker protein, forming a bridge between F-actin and intermediate filaments. Here, we have used two different antibody preparations against dystonin and detected a high molecular weight protein in immunoblot analysis of spinal cord extracts. We also show that this high molecular weight protein was not detectable in the nervous system of all *dt* alleles tested. Immunohistochemical analysis revealed that dystonin was present in different compartments of neurons - cell bodies, dendrites and axons, regions which are rich in the three elements of the cytoskeleton (F-actin, neurofilaments and microtubules). Ultrastructural analysis of *dt* dorsal root axons revealed disorganization of the neurofilament network and surprisingly also of the microtubule network. In this context it is of interest that we observed altered levels of the microtubule associated proteins MAP2 and tau in spinal cord neurons of different *dt* alleles. Finally, *dt* dorsal root ganglion neurons formed neurites in culture, but the cytoskeleton was disorganized within these neurites. Our results demonstrate that dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton integrity but is not required for establishing neuronal morphology.

## Introduction

*Dystonia musculorum (dt)* is a hereditary sensory neuropathy of the mouse. The phenotype is first recognizable between 7-10 days after birth when a homozygous *dt* mouse displays progressive loss of limb coordination (Duchen, 1976; Duchen *et al.*, 1963; Duchen and Strich, 1964). Accumulation of organelles and empty vacuoles within sensory axons, giant axonal swellings and neurodegeneration are observed in *dt*. The dorsal root and dorsal root ganglia (DRG) of *dt* mice are considerably smaller than those of wild type mice. The sensory roots of the cranial nerves, and the secondary sensory neurons in the spinal cord (Sotelo and Guenet, 1988) of *dt* mice are also affected by degeneration. A hallmark of *dt* pathology is accumulation of neurofilaments (NFs) in axonal swellings (Janota, 1972). The earliest reported appearance of axonal swellings is at four days after birth (Janota, 1972) suggesting that the presence of NF accumulation precedes neurodegeneration. Abnormal NFH/NFM phosphorylation and NF accumulation in the perikarya and proximal regions of axons of spinal cord neurons have been reported for another *dt* allele (Campbell and Peterson, 1992) and imply that NF processing is also an abnormal feature of *dt*. In this regard, it is interesting to note that neurofilament accumulation is a feature of many neurodegenerative diseases and of chemical intoxication (Bizzi *et al.*, 1984; Goldman and Yen, 1986).

We have identified the gene responsible for the *dt* disorder. The gene, named *dystonin (Dst)*, codes for two similar neuronal isoforms that differ only at their extreme N-terminal ends (Brown *et al.*, 1995a) (Fig. 1). Expression of the two *Dst* isoforms predominates in the neurons of the spinal and cranial sensory ganglia (Bernier *et al.*, 1995). These neurons are the principal sites of degeneration in *dt* mice. *Dst* is also expressed in other regions of the nervous system, including motor neurons, most of which are not affected by the degenerative process in *dt* mice (Bernier *et al.*, 1995; Dowling *et al.*, 1997). The two known neuronal isoforms of dystonin are alternate forms of the epithelial protein

bullous pemphigoid antigen 1 (Bpag1), an autoantigen in bullous pemphigoid disease. Both neuronal isoforms have an actin binding domain (ABD) N-terminal to the Bpag1 sequence (Fig. 1). Bpag1 is an intermediate filament (IF) anchoring protein localized to the hemidesmosomal plaques of keratinocytes (Jones *et al.*, 1994; Klatte and Jones, 1994; Mutasim *et al.*, 1985; Sawamura *et al.*, 1991). *Bpag1* inactivation in mice resulted in *dystonia musculorum*, fragile skin epithelia and lack of keratin filament association with the inner plate of hemidesmosomes (Guo *et al.*, 1995). Although we have named the neuronal isoforms of Bpag1 as dystonin (Brown *et al.*, 1995a), others have referred to these as Bpag1n (Yang *et al.*, 1996). It has been demonstrated by *in vitro* biochemical analysis and by co-transfections of Bpag1n1 (dystonin) and neurofilaments (NFL and NFH) into an IF deficient cell line, that Bpag1n1 links F-actin to NFs (Yang *et al.*, 1996). Thus, dystonin has the potential in neurons to serve as a bridge between F-actin and NFs, and therefore could act as a cytoskeletal organizer. The loss of this function is predicted to result in a disorganized neuronal cytoskeleton.

Here we have investigated the cellular and subcellular localization of dystonin in cells of the nervous system and determined the effect of a loss of dystonin function on organization of the neuronal cytoskeleton.

## Results

The characterization of the *Dst* gene led to the identification of two RNA splice products in neural tissues (Brown *et al.*, 1995a). Both of these transcripts have unique 5' sequences, a common sequence encoding an actin-binding domain, and sequences from the second to the last exon of *Bpag1* (see schematic in Fig. 1). The 9 kb *Bpag1* transcript is expressed in skin epidermal tissue (Sawamura *et al.*, 1990) and absent in neural tissues (Brown *et al.*, 1995a). The two neuronal alternative splice forms are also present in human (Brown *et al.*, 1995b) and chick (G.D. *et al.*, unpublished data) nervous systems. Northern blot analysis performed with a *Bpag1* cDNA probe on brain RNA from wild type and homozygous animals from different alleles of *dt* revealed that *Dst* transcripts were not detectable in mutant backgrounds (Fig. 2). This probe detects a 9 kb *Bpag1* mRNA in skin and ~15 kb *Dst* mRNA in the nervous system (previous estimates placed this transcript at ~12 kb, however direct comparison with the 14 kb dystrophin mRNA on Northern blots suggests that it is closer to 15 kb - (Bernier *et al.*, 1996)).

## Characterization of anti-dystonin antisera

In order to identify the protein products of *Dst*, we used a polyclonal antibody, gpAC1, generated against the N-terminal portion of dystonin. We also used a previously characterized monoclonal antibody (10C5 mAb) raised against an epitope in the central portion (aa 1909 to aa 2004) of the human BPAG1 protein (Hopkinson and Jones, 1994). This region is also present in both neural isoforms of dystonin (Fig. 1). The 10C5 antibody is specific for *Bpag1* as previously shown by immunofluorescence and Western blot analysis (Hopkinson and Jones, 1994). Polyclonal antibody gpAC1 was raised against a GST-tagged fusion protein in guinea pigs. To evaluate its specificity, whole gpAC1 serum and purified immunoglobulins from gpAC1 serum were used on Western blots of insect SF9 cell extracts containing a recombinant his-tagged dystonin fusion protein (Fig. 3A). Both the whole serum and purified gpAC1 immunoglobulins, but not the pre-immune



serum, selectively recognized the recombinant protein on Western blot and did not recognize other proteins present in the SF9 cell extracts (Fig. 3A). The recombinant protein recognized by gpAC1 was also detected using an anti his-tag mAb (Fig. 3A).

### ***Dst* encodes a high molecular weight protein in the nervous system**

The gpAC1 antibody and the 10C5 mAb were further evaluated by immunoblotting total protein extracts from mouse spinal cords. We had previously reported that *Dst* mRNA is present at high levels in the spinal cord (Bernier *et al.*, 1995). The Western blot analysis revealed specific recognition by both antibody preparations of a high molecular weight protein in spinal cord extracts from wild type mice (Fig. 3B). The high molecular weight protein band was not detected in spinal cord extracts from homozygous mice derived from four different alleles of *dt* (Fig. 3B).

Specificity of the gpAC1 antibody and the 10C5 mAb for dystonin was further demonstrated by immunohistochemistry. On sections of wild type ventral root, both 10C5 and gpAC1 antibodies labeled myelinated axons and Schwann cell cytoplasm (Fig. 4A, B). Labeling was excluded from the myelin sheath. In contrast to the wild type situation, *dt*<sup>27J/dt</sup><sup>27J</sup> mutant mouse ventral root sections did not show labeling of axons and Schwann cell cytoplasm (Fig. 4D, E).

### **Dystonin is distributed throughout the nervous system**

We performed immunocytochemistry with the gpAC1 antibody and the 10C5 mAb on sections of neural tissues. Similar results were obtained with both antibody preparations and representative results with 10C5 mAb are shown in Figure 5. Cryostat sections of a dissected mouse spinal cord and associated DRGs were processed for immunofluorescence. A specific signal was observed in the cytoplasm of the cell body in every DRG neuron. The cell body signal consisted of diffuse and punctate patterns (Fig. 5A). Using immunohistochemistry, we observed specific labeling in the gray and white

matter of adult rat spinal cord (Fig. 5B). Cell bodies and dendrites of the  $\alpha$ -motor neurons (laminae IX) were labeled as were the cell bodies and the dendrites of second order sensory neurons from laminae I to VII. A high magnification view of a lower motor neuron showed specific labeling in the cytoplasm of the cell body and in the dendrites (Fig. 5C). No nuclear labeling was observed. Myelinated axons throughout the white matter were labeled. High magnification of the ventral myelinated axons showed that the expression of the protein was restricted to the axons and was not present within the myelin sheath (Fig. 5D). Specific labeling of dystonin was observed in the cerebral cortex, hippocampus, ventral thalamic neurons, putamen/caudate, brain stem and cerebellum (Fig. 5E). High magnification view of the cerebellum demonstrated the presence of the protein in the granular, molecular and Purkinje cell layers (Fig. 5F). Sagittal vibratome sections of rat and mouse adult brain gave similar results. Thus we conclude that dystonin is a cytoplasmic protein that is present in different compartments of a mature neuron: the cell body, dendrites and axons.

### **The cytoskeleton is disorganized in the DRG neurons of *dt* mice**

Since dystonin is a cytoskeletal linker protein, loss of its activity should result in disorganization of the neuronal cytoskeleton. To evaluate this hypothesis, we fixed *dt<sup>27J</sup>/dt<sup>27J</sup>* mice and their wild type littermates, and processed the dissected dorsal roots for EM observation. As previously reported for *dt* mice (Al-Ali and Al-Zuhar, 1989; Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964; Hanker and Peach, 1976; Kothary *et al.*, 1988), we observed degeneration of the large myelinated axons in the dorsal root. The presence of accumulated organelles, dense and membranous bodies and empty vacuoles are the degeneration characteristics that were observed (Fig. 6A, B). Segmental demyelination was also frequently observed (Fig. 6A). Around the accumulated organelles, a dense and disorganized neurofilament network was noticeable (Fig. 6B). In dorsal roots of *dt* mice at the phenotype stage (2 weeks), we also observed normally myelinated axons with no

obvious accumulation of organelles except that these axons had a large diameter (Fig. 6D). Upon closer examination, we observed that these swollen axons contained disorganized NF and microtubule (MT) networks when compared to wild type dorsal root axons (Fig. 6C). For example, in *dt<sup>27J</sup>/dt<sup>27J</sup>* mice, the NFs and MTs were not oriented along the long axis of the axon as observed in the wild type axon (compare insets in Fig. 6C, D), but were aligned in no particular direction. Thus absence of dystonin has resulted in cytoskeletal disorganization.

In order to evaluate if disorganization of the cytoskeleton is an early event in *dt* pathogenesis, we cultured DRG neurons from homozygous genotyped newborn mice. These cultures give us the advantage of examining newly extended neurites for the effects of the mutation on the organization of the cytoskeleton. All cultures were allowed to grow for 48 hours before fixation. Like the wild type, *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* DRG neurons were capable of forming neurites (Fig. 7A, C). Examination by phase contrast light microscopy of neurons from wild type and *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* cultures did not show drastic differences in growth characteristics. To characterize the cytoskeleton in neurites, wild type and mutant DRG neuron cultures were embedded in resin and processed for EM observation. Corroborating the *in vivo* results, we observed a disorganized NF and MT network in *dt/dt* neurites (Fig. 7D) while wild type neurites displayed a normally organized network (Fig. 7B).

### **Dystonin is co-localized with the neuronal cytoskeleton**

To determine the subcellular localization of the *Dst* protein products, we focused our attention on spinal cord neurons. Vibratome sections of rat spinal cord were processed for immunohistochemistry with the gpAC1 Ab and the 10C5 mAb, and analyzed by EM. With both antibodies, we observed strong labeling of myelinated axons and dendrites, which are rich in NFs and MTs respectively. In cross-sections of myelinated axons of the

ventral white matter, we detected DAB precipitate decorating the cytoskeleton (Fig. 8B). In sections of dendrites in the gray matter, we observed a similar labeling with both antibody preparations (Fig. 8C and D). In contrast, we did not observe any DAB labeling in synapses (Fig. 8C and D). Control sections not incubated with the primary antibody but which were otherwise processed as other sections, do not show any DAB precipitate in EM (e.g. Fig. 8A). This analysis demonstrates that dystonin is present in cytoskeletal-rich regions of neurons.

### **Microtubule associated proteins are affected in *dt* spinal cord neurons**

Since *dt/dt* axons contained disorganized MTs, we evaluated the overall levels of proteins associated with these filaments (MAP2 and tau) in spinal cord extracts. These proteins are necessary for the organization and stability of the MTs in dendrites (MAP2) and axons (tau) (Hirokawa, 1994). Moreover, MAP2 and tau are localized to the cross-bridges on the side of MTs, where they could participate in protein-protein interactions with other cytoskeletal proteins (Bloom and Vallee, 1983). To quantitatively compare the levels of these proteins in mutant and wild type mice, we performed Western blot analysis on spinal cord protein extracts using a mAb targeting both tau and MAP2. Protein samples from at least two different affected mice of the different *dt* alleles were tested with each antibody. The 46.1 mAb against the tau and MAP2 proteins detected the expected pattern of bands in wild type samples (Fig. 9A). The intensity of the bands was altered in extracts from different *dt* homozygous animals when compared to wild type samples (Fig. 9A). A decrease in the intensity of the band pattern was observed in extracts from homozygous mice of alleles *dt<sup>Tg4</sup>*, *dt<sup>24J</sup>* and *dt<sup>Alb</sup>*. The tau and MAP2 protein levels were decreased by at least three fold, and in the case of *dt<sup>Alb</sup>* the bands were barely detectable (Fig. 9A). A similar experiment was performed on an entire litter of mice from a *dt<sup>24J</sup>/+* x *dt<sup>24J</sup>/+* mating. The MAP2 protein band intensity is reduced in the spinal cord extracts of all 4 homozygotes when compared to that from 2 wild type littermates (Fig. 9B). Equal protein

loading was checked by re-incubating the membranes with an anti-tubulin antibody (shown at the bottom of Fig. 9A, B).

The changes in MAP2 and tau protein levels could be the result of abnormal transcription as a consequence of the different *dt* mutations. To test this possibility, Northern blot analysis with the mouse *MAP2* cDNA probe was carried out. On wild type and *dt* brain RNA from P14 animals, we detected the expected 9 kb *MAP2* transcript (Fig. 9C). The intensity of the signals was comparable between wild type and mutant RNA samples from different *dt* alleles. Similar results were obtained when RNA from spinal cords of wild type and *dt* mice were analyzed (data not shown). Thus the reduction in MAP2 protein levels in *dt* spinal cords is not due to transcriptional changes, but rather reflects alterations of the cytoskeleton.

## Discussion

Here we have investigated the cellular and subcellular localization of dystonin *in vivo*. Dystonin was present in neuronal compartments containing the three elements of the cytoskeleton: cell bodies, dendrites and axons. However, dystonin was not detected in synapses and dendritic spines, morphological defined structures that mainly contain actin microfilaments. Ultrastructural analysis of *dt* DRG neurites and dorsal root axons revealed a disorganized neurofilament network. Surprisingly, the microtubule network was also disorganized. We showed that the expression level of the microtubule associated proteins, MAP2 and tau, was altered in spinal cord neurons of *dt* mice. We conclude that dystonin is essential for maintaining cytoskeleton integrity in neurons.

Antibodies against dystonin, namely the gpAC1 polyclonal antibody and the 10C5 mAb, identified a high molecular weight protein in extracts of spinal cords from wild type mice. This protein was not detected in protein extracts from homozygous mice derived from 4 different *dt* alleles. Immunohistochemistry using gpAC1 and the 10C5 mAb gave a specific DAB labeling of the myelinated axons in wild type mouse ventral root sections but not in similar sections from *dt*<sup>27J</sup> mutant mice. Immunohistochemical analysis revealed the presence of dystonin in DRG neurons with large caliber axons and in the secondary sensory neurons of the spinal cord. These are the neurons that degenerate in *dt* mice. Dystonin is also present in neurons unaffected by the disease process - DRG neurons with small caliber axons, neurons of the extrapyramidal system and in the cerebellum as well as in  $\alpha$ -motor neurons of the spinal cord. The presence of *Dst* mRNA and protein products in both sensory and motor neuron populations raises an important question regarding the selective nature of neuropathy in *dt* mice. Why are motor neurons more resistant to the *dt* genetic defect than are sensory neurons? One possible explanation is that motor neurons are inherently different from sensory neurons. This difference is well exemplified by the demonstration that in transgenic mice, NF subunit overexpression in motor and sensory

neurons is much more detrimental to the motor neurons (Coté *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1993) suggesting that sensory and motor neurons are differently affected by cytoskeleton disorganization. The differential vulnerability to dystonin loss of function might be explained by the expression of a related gene product specifically in motor neurons.

Our studies suggest that dystonin associates *in vivo* with cytoskeletal elements in different neuronal compartments. Two different antibodies against dystonin showed that it was localized in compartments of neurons (axons and dendrites) where there is a high density of NFs and MTs. Dendrites contain mainly MTs whereas axons are enriched in NFs. Interestingly, the expression of dystonin appears to be similar in dendrites and axons even though the ratio of MTs-NFs is different in these two cellular compartments. This reinforces the role of dystonin in the overall organization of neuronal cytoskeleton. In contrast, dystonin was shown to be absent in synapses which are generally devoid of NFs and MTs (Peters *et al.*, 1991). Yang *et al.* (1996) demonstrated that the N-terminal portion of dystonin was capable of binding actin filaments *in vitro* and that the C-terminal portion of dystonin associated with NFH in a co-precipitation assay. Furthermore, they showed re-organization of F-actin and NFs in co-transfection experiments with dystonin. Taken together, these data suggest that dystonin serves as a linker between F-actin and NFs in neurons. Our EM analysis also suggests that dystonin is localized with MTs. However, diffusion of the peroxidase reaction products is a possibility and further studies are necessary to determine if dystonin is associated with MTs. In this context, Svitkina *et al.* (1996) demonstrated by subcellular localization that in cultured fibroblasts plectin, another cytoskeletal linker protein, is part of IF sidearms which connect IFs to MTs and to the actin-based cytoskeleton. Others had previously shown that plectin is localized on microfilaments and intermediate filaments (Seifert *et al.*, 1992). Moreover, *in vitro* interactions between plectin and  $\alpha$ -spectrin, vimentin, MAP1 and MAP2 have also been

shown (Herrmann and Wiche, 1987). Thus plectin is a multifunctional crosslinker of different cytoskeletal elements. Recent cloning of human plectin cDNA (McLean *et al.*, 1996) revealed striking homology with human dystonin (Brown *et al.*, 1995b) throughout their coding sequences. Like dystonin, human plectin contains an N-terminal actin-binding domain with homology to the ABDs of  $\beta$ -spectrin and dystrophin (McLean *et al.*, 1996). Furthermore, the similarity between plectin and dystonin is extensive - 77% in the N-terminal 452 amino acids and 65% in the C-terminal 1429 amino acids (R.K., unpublished observations). Interestingly, a defect in human plectin has recently been associated with epidermolysis bullosa with muscular dystrophy (McLean *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996). Based on the strong homology to human plectin, it is possible that dystonin has similar activities in neurons. Within the axonal cytoskeleton, cross-bridges exist between MTs, NFs, MTs-NFs, MTs-actin, and NFs-actin (Hirokawa, 1982). Thus dystonin and plectin could be part of these cross-bridges serving as crosslinkers between larger filaments - IFs and MTs - and F-actin.

Our present knowledge about dystonin suggests that it is a cytoskeletal linker protein, and as such mutations in dystonin should lead to disorganization of the neuronal cytoskeleton. We showed that the dorsal roots of *dt<sup>27J</sup>* homozygous mice contained axons with histopathological features. The large myelinated axons contained accumulated organelles, disorganized NFs and displayed segmental demyelination. We also observed healthier myelinated axons displaying only increased diameters in *dt<sup>27J</sup>* dorsal roots. In these latter axons we observed accumulation and disorganization of NFs and MTs. This disorganization appears as a loss of NF and MT compactness. These filaments are twisted around each other and in extreme cases, massively accumulated in axonal swellings. Thus we conclude that in these neurons a dystonin mutation affects cytoskeletal organization.



A question that was raised from the *in vivo* ultrastructural studies was whether a newly generated cytoskeleton would be affected by the *dt* mutation. We took advantage of DRG neuron cultures to address this point. We showed that DRG neurons from *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* newborn mice are capable of neurite formation in culture. In newly formed neurites (48 hour cultures), ultrastructural analysis showed disorganization of NFs and MTs. This strongly suggests that the primary defect of *dt* DRG neurons resides in the maintenance of NF and MT organization in neurites. It also suggests that dystonin does not play an essential role in the early phase of neurite outgrowth where F-actin and MTs are the major cytoskeletal elements involved (Mitchison and Kirschner, 1988). NFs are not necessary for axonogenesis *per se*, since axons of transgenic mice expressing a *NFH-lacZ* fusion gene are devoid of neurofilaments (Eyer and Peterson, 1994). The function of dystonin would be more crucial in a phase where organization of NFs and MTs is necessary. Consistent with this idea, nervous system development proceeds normally up to birth in *dt* mice (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964). Motor and sensory neurons in *dt* mice send out extensions that make proper contacts with their distant targets. The observation of cytoskeletal disorganization in cultured DRG neurons reinforces the observation of Campbell and Peterson (1992) that the primary neurodegenerative defect in *dt* mice is intrinsic to the neuron, rather than in Schwann cells.

Perhaps the most surprising observation was that of MT disorganization in *dt* neurons. MAP and tau are known to stabilize MTs *in vitro* and *in vivo* (Hirokawa, 1994). We therefore assessed the levels of these proteins in *dt* mice. For three alleles of *dt*, homozygous mice displayed a significant reduction in the levels of MAP2 and tau in spinal cord neurons. We interpret these results as indicative of cytoskeletal disorganization and this further implicates dystonin involvement in MT organization. The decreased levels of MAPs observed in *dt* mice could be the result of a rapid protein turnover. Such a phenomenon has been demonstrated for microinjected MAP2 that remained unassociated

with axonal MTs in cultures of spinal cord neurons (Okabe and Hirokawa, 1989). In *dt*, Northern blot analysis showed that the abnormality in MAP2 levels is restricted to proteins since RNA levels were comparable between mutant and wild type animals. Collectively our results on dystonin localization, disorganization of MTs in *dt* neurons and effects on MAP levels in *dt* spinal cords strongly suggest that dystonin participates in the maintenance of MT organization in dendrites and axons.

We propose that disorganization of the NF and MT cytoskeleton in axons may be the initial step in the molecular pathogenesis in *dt* mice. This would progressively result in impaired axonal physiology. For example, axonal transport which is dependent on MTs would be affected, resulting in accumulation of cytoplasmic components within axonal swellings. This would ultimately lead to death of the neuron. The *dt* mutation illustrates the important role of molecules that organize NFs and MTs in order to maintain a functional neuron.

## **Experimental Methods**

### ***Animals***

CD1 random-bred mice and rats were purchased from Charles River Canada. The *dt<sup>Tg4</sup>* (Kothary *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1994), *dt<sup>24J</sup>*, *dt<sup>27J</sup>* (Bernier *et al.*, 1995) and *dt<sup>Alb</sup>* (Messer and Strominger, 1980) lines have been described before. The *dt<sup>Alb</sup>* mice were bred at the Wadsworth Center, N.Y. State Department of Health, Albany, N.Y. All animal procedures have been approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

### ***Antibodies***

A recombinant dystonin polypeptide [amino acids 123 to 257 based on the sequence presented in Brown *et al.* (1995a) under the accession number U25158 (see relative position in Fig. 1)] was expressed as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein (Pharmacia) in *Escherichia coli* according to the manufacturers' protocol. In-frame cloning of the cDNA insert was verified by DNA sequence analysis. The fusion protein of the expected size was found to be mostly insoluble in nondenaturing buffer, but a small fraction was soluble and could be purified by glutathione-Sepharose affinity chromatography (Pharmacia). Guinea pigs were immunized with subcutaneous injections of this fusion protein using a standard animal protocol (Harlow and Lane, 1988). Antibodies (which we named gpAC1) targeting the fusion protein were further purified using the antigen immobilized on nitrocellulose discs.

The 10C5 ascites fluid was kindly provided by Dr. Jonathan Jones (NorthWestern University, Chicago). Antibody 46.1 against MAP2 and tau was from Dr. Virginia Lee (University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia). The antibody against  $\alpha$ -tubulin (DM1a) was purchased from Sigma (USA). The anti-his mAb was purchased from InVitrogen (USA). The biotinylated anti-IgG (guinea pig) was from Jackson Immunoresearch. The biotinylated antibody against mouse Ig was from Vector (Ontario, Canada). The peroxidase conjugated streptavidin was obtained from Amersham (Canada).

### ***Northern blot analysis***

Approximately 10  $\mu$ g of total RNA was used in Northern blot analysis as described previously (Brown *et al.*, 1995a). Probes consisted of a cDNA fragment from mouse *Bpag1* (Brown *et al.*, 1995a), a mouse *MAP2* cDNA fragment (Leclerc *et al.*, 1996) and the human *GAPDH* cDNA (Tso *et al.*, 1985).

### ***Protein Analysis***

The baculovirus system was used to produce a recombinant his-tagged fusion protein encoding amino acid 123 to 680 of dystonin based on the sequence presented in Brown *et al.* (1995a) under the accession number U25158. The production of the recombinant protein in insect SF9 cells was as described previously (Leclerc *et al.*, 1996). SF9 cells were infected at a multiplicity of infection of 5 with the virus encoding either the his-tagged fusion protein or his-tag alone. Two days after infection, cells were harvested and extracted in protein sample buffer (Laemmli, 1972). Similarly, mouse spinal cords were extracted directly in protein sample buffer (Laemmli, 1972). For comparative analysis between mutant and wild type animals, we used phenotype stage and wild type animals of the same age (13 days after birth). Equal amounts of proteins (about 50 µg) were separated on a denaturing SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond extra-c, Amersham, Canada) by electroblotting (Harlow and Lane, 1988). Membranes were blocked in PBS supplemented with 3% BSA and skimmed milk powder at 5% for 3 hours. All antibodies were incubated at room temperature in PBS containing 3% BSA. Primary antibodies, the biotinylated secondary antibodies and streptavidin-peroxidase were incubated for one hour. Immunoreactive proteins were detected with an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham, Canada) according to the manufacturers' instructions.

### ***DRG neuron cultures***

Primary cultures of newborn DRG neurons were established according to the culture conditions of Morris and Hollenbeck (1995). Briefly, DRGs were dissected in L15 media (Gibco-BRL, Ontario, Canada), cut into four pieces and plated on collagen (Boehringer Mannheim, Montréal, Canada) in complete media. The cells were allowed to grow for 48 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The culture media consisted of DMEM, 10% FBS, NGF (Boehringer Mannheim, Montréal, Canada) at 200 ng/ml, and supplemented with 2 mM L-glutamine and with Gibco vitamin mix at 1/100 dilution. The same procedure was

applied for DRG neuron cultures of  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice; the whole litter progenies of a cross between heterozygous parents were processed the same way. Genomic DNA from each individual was extracted from a tail biopsy and a diagnostic PCR at the  $dt$  locus was performed to identify  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice. For ultrastructural analysis, the culture media was removed and replaced by a fixative containing 0.1 M cacodylate (pH 7.4) and 3.5% gluteraldehyde. Cells were fixed for 1 hour and processed for electron microscopy.

### ***Histology***

To generate vibratome sections, adult rats and mice were anaesthetized and perfused with a fixative containing 0.1 M cacodylate (pH7.4) and 3.5% gluteraldehyde. Brains and spinal cords were dissected and fixed by immersion for another 2 hours. The fixed tissues were cut into sections of 50  $\mu\text{m}$  and processed for immunocytochemistry. For the cryostat sections of spinal cords and DRGs, 15 day old mice were perfused with 4% paraformaldehyde in PBS, spinal cord and DRGs were dissected and fixed for another 5 hours in the same fixative, cryoprotected in 25% glucose, and embedded in OCT Compound (Miles, Canada). Sections of 10  $\mu\text{m}$  were generated and processed for immunofluorescence. For EM analysis of dorsal root, mice were anaesthetized and perfused with fixative containing 0.1 M cacodylate (pH 7.4), 3.5% gluteraldehyde and 2.5% DMSO. Spinal cord and lumbar dorsal roots were dissected in the fixative and incubated for another 5 hours in the same fixative. Dorsal roots were treated with 1% osmium for one hour, dehydrated and embedded in resin. Sections were collected on grids, stained with lead citrate and observed in EM.

### ***Immunocytochemistry***

Immunocytochemistry was performed on 50  $\mu\text{m}$  floating rat and mouse vibratome sections and on 25  $\mu\text{m}$  cryostat sections. The sections were permeabilized with 0.3% triton and treated with 2 mg/ml sodium borohydride. The 10C5 mAb from ascites was used

1/100. Bound antibodies were detected using a biotinylated anti-mouse Ig and streptavidin conjugated horseradish peroxidase. The gpAC1 antiserum was used 1/200. Bound antibodies were detected using a biotinylated anti-guinea pig Ig and streptavidin conjugated horseradish peroxidase. Vibratome sections were incubated in DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma, USA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to reveal the peroxidase activity (Harlow and Lane, 1988). Sections were dehydrated and mounted with Permount for light microscopy or embedded in resin for EM observation. Immunofluorescence was performed on cryostat sections of DRG. Sections were treated as for DAB immunocytochemistry except that bound antibodies were detected using FITC conjugated streptavidin.

### **Acknowledgments**

Our thanks to Gilbert Bernier for critical reading of the manuscript. Thanks also to Dr. Jonathan Jones for the 10C5 mAb, to Dr. Lisa McKerracher for assistance in DRG neuron cultures and to Dr. Virginia Lee for 46.1 mAb against MAP2 and tau. We thank Mr. Luc Lauzière and Mr. Gaston Lambert for excellent photographic work. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada to R.K. and N.L.. G.D. was supported by a Studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, and R.K. and N.L. are Scholars of the FRSQ.

### **References**

- Al-Ali, S.Y., and Al-Zuhair, A.G.H. (1989). Fine structural study of the spinal cord and spinal ganglia in mice afflicted with a hereditary sensory neuropathy, dystonia musculorum. *J. Submicroscopic Cytol. Pathol.* **21**: 737-748.
- Bernier, G., Brown, A., Dalpé, G., De Repentigny, Y., Mathieu, M., and Kothary, R. (1995). Dystonin expression in the developing nervous system predominates in the neurons that degenerate in *dystonia musculorum* mutant mice. *Mol. Cell. Neurosci.* **6**: 509-520.

- Bernier, G., Mathieu, M., De Repentigny, Y., Vidal, S.M., and Kothary, R. (1996). Cloning and characterization of mouse ACF7, a novel member of the dystonin subfamily of actin binding proteins. *Genomics* **38**: 19-29.
- Bizzi, A., Crane, R.C., Autilio-Gambetti, L., and Gambetti, P. (1984). Aluminum effect on slow axonal transport: a novel impairment of neurofilament transport. *J. Neurosci.* **4**: 722-731.
- Bloom, G.S., and Vallee, R.B. (1983). Association of microtubule-associated protein 2 (MAP2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells. *J. Cell Biol.* **96**: 1523-1531.
- Brown, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Rossant, J., and Kothary, R. (1994). The genomic structure of an insertional mutation in the *dystonia musculorum* locus. *Genomics* **20**: 371-376.
- Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J., and Kothary, R. (1995a). The mouse *dystonia musculorum* gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nature Genet.* **10**: 301-306.
- Brown, A., Dalpé, G., Mathieu, M., and Kothary, R. (1995b). Cloning and characterization of the neural isoforms of human dystonin. *Genomics* **29**: 777-780.
- Campbell, R.M., and Peterson, A.C. (1992). An intrinsic neuronal defect operates in dystonia musculorum: a study of *dt/dt*  $\leftrightarrow$  *+/+* chimeras. *Neuron* **9**: 693-703.
- Coté, F., Collard, J.F., and Julien, J.-P. (1993). Progressive neuropathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy chain: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* **73**: 35-46.
- Dowling, J., Yang, Y., Wollmann, R., Reichardt, L.F., and Fuchs, E. (1997). Developmental expression of BPAG1n: insights into the spastic ataxia and gross neurologic degeneration in *dystonia musculorum* mice. *Dev. Biol.* **187**: 131-142.

- Duchen, L.W., Falconer, D.S., and Strich, S.J. (1963). Dystonia Musculorum. A hereditary neuropathy of mice affecting mainly sensory pathways. *J. Physiol. (Lond.)* **165**: 7-9.
- Duchen, L.W., and Strich, S.J. (1964). Clinical and pathological studies of an hereditary neuropathy in mice. *Brain* **87**: 367-378.
- Duchen, L.W. (1976). Dystonia musculorum - an inherited disease of the nervous system in the mouse. *Adv. Neurol.* **14**: 353-365.
- Eyer, J., and Peterson, A. (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* **12**: 389-405.
- Goldman, J.E., and Yen, S.H. (1986). Cytoskeletal protein abnormalities in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* **19**: 209-223.
- Guo, L.F., Degenstein, L., Dowling, J., Yu, Q.C., Wollmann, R., Perman, B., and Fuchs, E. (1995). Gene targeting of *bpag1* - abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* **81**: 233-243.
- Hanker, J.S., and Peach, R. (1976). Histochemical and ultrastructural studies of primary sensory neurons in mice with dystonia musculorum. I. Acetylcholinesterase and lysosomal hydrolases. *Neuropath. App. Neurobiol.* **2**: 79-97.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Herrmann, H., and Wiche, G. (1987). Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J. Biol. Chem.* **262**: 1320-1325.
- Hirokawa, N. (1982). Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etch method. *J. Cell Biol.* **94**: 129-142.



- Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 74-81.
- Hopkinson, S.B., and Jones, J.C. (1994). Identification of a second protein product of the gene encoding a human epidermal autoantigen. *Biochem. J.* **300**: 851-857.
- Janota, I. (1972). Ultrastructural studies of an hereditary sensory neuropathy in mice (dystonia musculorum). *Brain* **95**: 529-536.
- Jones, J.C., Asmuth, J., Baker, S.E., Langhofer, M., Roth, S.I., and Hopkinson, S.B. (1994). Hemidesmosomes: extracellular matrix/intermediate filament connectors. *Exp. Cell Res.* **213**: 1-11.
- Klatte, D.H., and Jones, J.C. (1994). Purification of the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BP230) from bovine tongue mucosa: structural analyses and assessment of BP230 tissue distribution using a new monoclonal antibody. *J. Invest. Dermatol.* **102**: 39-44.
- Kothary, R., Clapoff, S., Brown, A., Campbell, R., Peterson, A., and Rossant, J. (1988). A transgene containing *lacZ* inserted into the dystonia locus is expressed in neural tube. *Nature* **335**: 435-437.
- Laemmli, E.K. (1972). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leclerc, N., Bass, P.W., Garner, C.C., and Kosik, K.S. (1996). Juvenile and mature MAP2 isoforms induce distinct patterns of process outgrowth. *Mol. Biol. Cell* **7**: 443-455.
- Lee, M.K., Marszalek, J.R., and Cleveland, D.W. (1994). A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* **13**: 975-988.
- McLean, W.H.I., Pulkkinen, L., Smith, F.J.D., Rugg, E.L., Lane, E.B., Bullrich, F., Burgeson, R.E., Amano, S., Hudson, D.L., Owaribe, K., McGrath, J.A., McMillan, J.R., Eady, R.A.J., Leigh, I.M., Christiano, A.M., and Uitto, J. (1996).

- Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes Dev.* **10**: 1724-1735.
- Messer, A., and Strominger, N.L. (1980). An allele of the mouse mutant *dystonia musculorum* exhibits lesions in red nucleus and striatum. *Neurosci.* **5**: 543-549.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics in nerve growth. *Neuron* **1**: 761-772.
- Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* **131**: 1315-1326.
- Mutasim, D.F., Takahashi, Y., Labib, R.S., Anhalt, G.J., Patel, H.P., and Diaz, L.A. (1985). A pool of bullous pemphigoid is intracellular and associated with the basal cell cytoskeleton-hemidesmosome complex. *J. Invest. Dermatol.* **84**: 47-53.
- Okabe, S., and Hirokawa, N. (1989). Rapid turnover of microtubule-associated protein MAP2 in the axon revealed by microinjection of biotinylated MAP2 into cultured neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 4127-4131.
- Peters, A., Palay, S.L., and Webster, H.d. (1991). *The Fine Structure of the Nervous System. Neurons and their Supporting Cells*. 3rd edition. Oxford University Press, New York, 494 p.
- Sawamura, D., Nomura, K., Sugita, Y., Mattei, M.G., Chu, M.L., Knowlton, R., and Uitto, J. (1990). Bullous pemphigoid antigen: cDNA cloning and mapping of the gene to the short arm of human chromosome 6. *Genomics* **8**: 722-726.
- Sawamura, D., Li, K.-H., Chu, M.-L., and Uitto, J. (1991). Human Bullous Pemphigoid Antigen 1 (BPAG1): Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J. Biol. Chem.* **266**: 17784-17790.
- Seifert, G.J., Lawson, D., and Wiche, G. (1992). Immunolocalization of the intermediate filament-associated protein plectin at focal contacts and actin stress fibers. *Eur. J. Cell Biol.* **59**: 138-147.

- Smith, F.J.D., Eady, R.A.J., McMillan, J.R., Leigh, I.M., Geddes, J.F., Rugg, E.L., Kellsell, D.P., Bryant, S.P., Spurr, N.K., Kirtschig, G., Milana, G., de Bono, A.G., Owaribe, K., Wiche, G., Pulkkinen, L., Uitto, J., McLean, W.H.I., and Lane, E.B. (1996). Plectin deficiency: Hereditary basis for muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nature Genet.* **13**: 450-457.
- Sotelo, C., and Guenet, J.L. (1988). Pathologic changes in the CNS of dystonia musculorum mutant mouse: an animal model for human spinocerebellar ataxia. *Neurosci.* **27**: 403-424.
- Svitkina, T.M., Verkhovsky, A.B., and Borisy, G.G. (1996). Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **135**: 991-1007.
- Tso, J.Y., Sun, X.H., Kao, T.H., Reece, K.S., and Wu, R. (1985). Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucl. Acids Res.* **13**: 2485-2502.
- Wong, P.C., Marszalek, J., Crawford, T.O., Xu, Z., Hsieh, S.T., Griffin, J.W., and Cleveland, D. W. (1995). Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. *J. Cell Biol.* **130**: 1413-1422.
- Xu, Z., Cork, L.C., Griffin, J.W., and Cleveland, D.W. (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* **73**: 23-33.
- Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q.-C., Kouklis, P., Cleveland, D.W., and Fuchs, E. (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* **86**: 655-665.

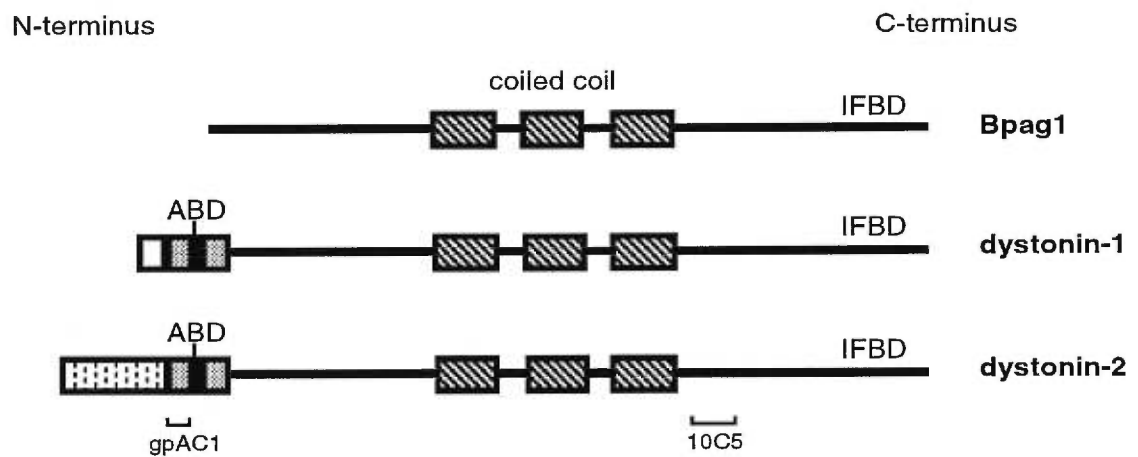


Figure 1. Schematic representation of the protein structures of Bpag1 and the neural isoforms of dystonin. Dystonin isoforms differ only at their extreme N-terminal end. The positions of the gpAC1 and 10C5 epitopes are shown. Note that gpAC1 only recognizes the neural isoforms whereas 10C5 recognizes all three isoforms. ABD, actin binding domain; IFBD, intermediate filament binding domain.

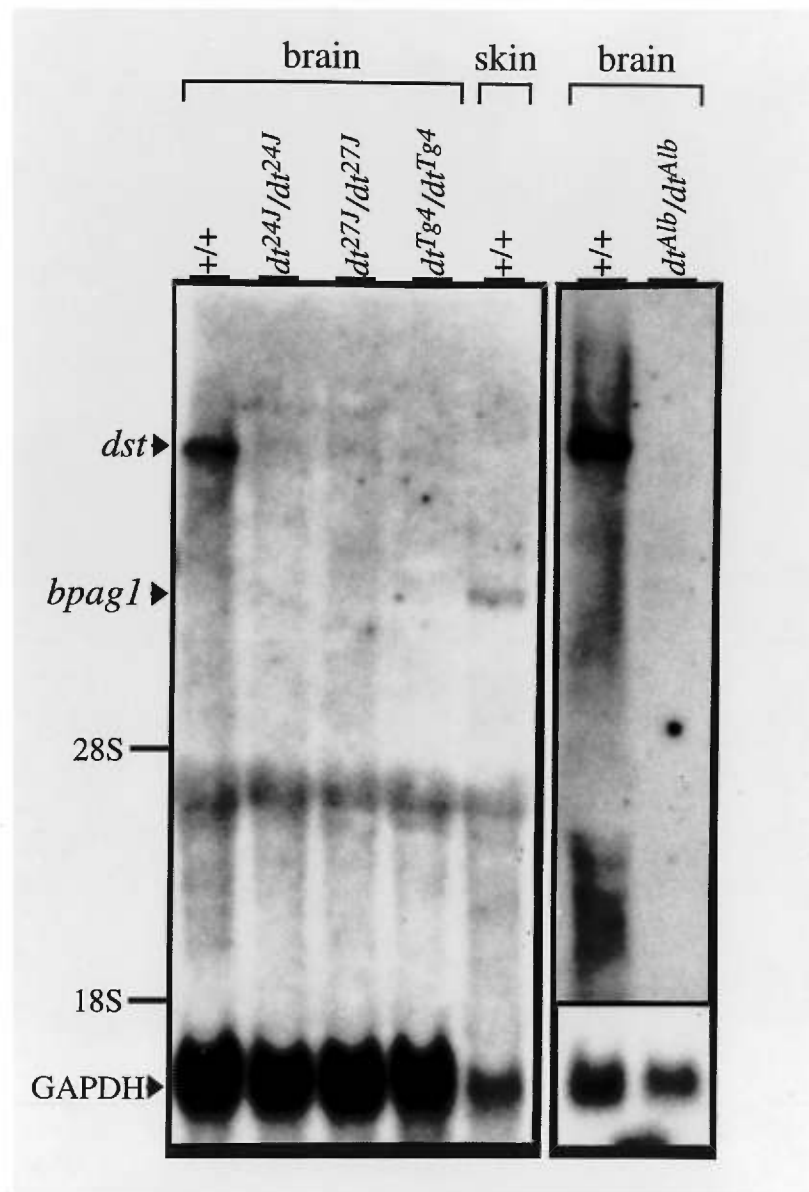


Figure 2. Abnormal *Dst* transcripts in four different *dt* mutants. Total RNA from brains of wild type, *dt<sup>24J</sup>*, *dt<sup>27J</sup>*, *dt<sup>Tg4</sup>* and *dt<sup>Alb</sup>* mice was resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with a radiolabeled *Bpag1* cDNA. A ~15 kb mRNA is detected in wild type brain and no signal is observed in mutant brain RNA. The same probe detects a 9 kb RNA band in a wild type skin sample. The blot was rehybridized with a *GAPDH* cDNA to monitor amount of RNA loaded in each lane. The positions of the 28S and 18S ribosomal RNAs are shown.

Figure 3. Immunoblot analysis of dystonin. *A*, Characterization of the polyclonal antibody gpAC1. Schematic representation of the bacterial produced GST-fusion and the baculovirus produced his-tagged recombinant proteins is shown at the top. Extracts of insect SF9 cells infected with either control virus (his) or the virus producing the dystonin fusion protein (his-Dst N-ter) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. Anti-his mAb detected the full length recombinant protein and a slightly smaller degradation product (both indicated by arrowheads) in his-Dst N-ter extracts but not in control extracts (panel 1). The same protein bands were also detected by gpAC1 whole serum or gpAC1 purified immunoglobulins (panels 3 and 4). In contrast, pre-immune serum was not capable of detecting these proteins (panel 2). Molecular weight markers (Bio-Rad) in kD are indicated on the left. *B*, Spinal cord protein extracts from wild type (wt), *dt<sup>Tg4</sup>*, *dt<sup>24J</sup>*, *dt<sup>27J</sup>* and *dt<sup>Alb</sup>* mice were separated on a 3% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with the gpAC1 Ab (left panel) or the 10C5 mAb (right panel). The same high molecular weight protein band was detected by both antibody preparations in wild type extracts (arrow) but not in extracts from the 4 different *dt* alleles. The 208 kD molecular weight marker is indicated.

A



B

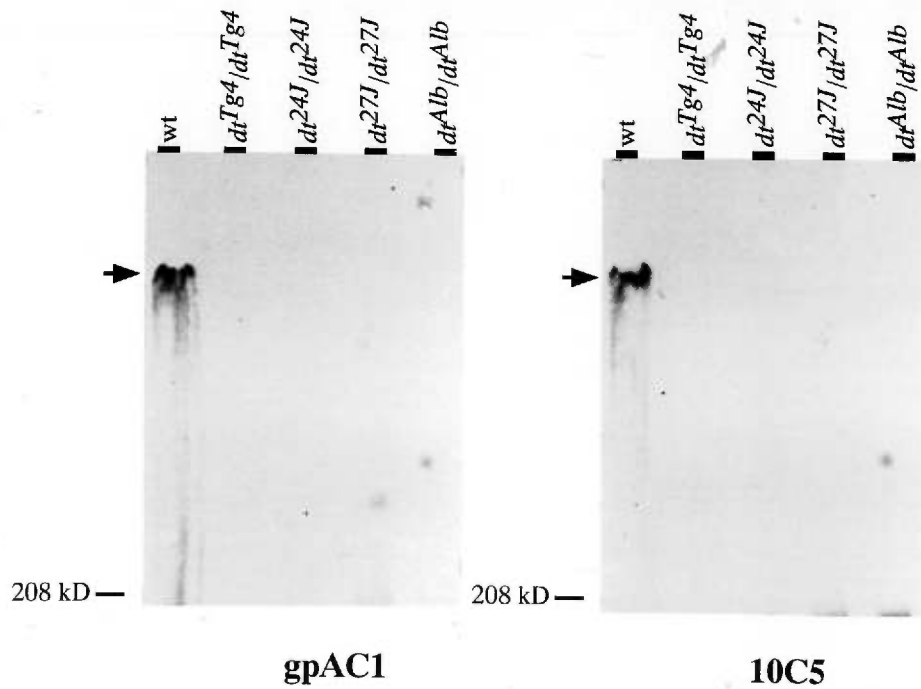


Figure 4. Specificity of the 10C5 mAb and the gpAC1 Ab in immunohistochemical analysis. Sections of ventral roots from P15 wild type (A-C) and *dt<sup>27J</sup>/dt<sup>27J</sup>* (D-F) mice. In wild type roots, both 10C5 mAb (A) and gpAC1 (B) detected dystonin in myelinated axons (short arrows) and in Schwann cell cytoplasm (long arrows). Note the absence of signal within the myelin sheath. No labeling was observed in sections of *dt<sup>27J</sup>/dt<sup>27J</sup>* ventral roots with either antibody (D and E). Cresyl violet staining confirmed the presence of myelinated axons and Schwann cells in both wild type and mutant root sections (C and F). Original magnification, 400x.



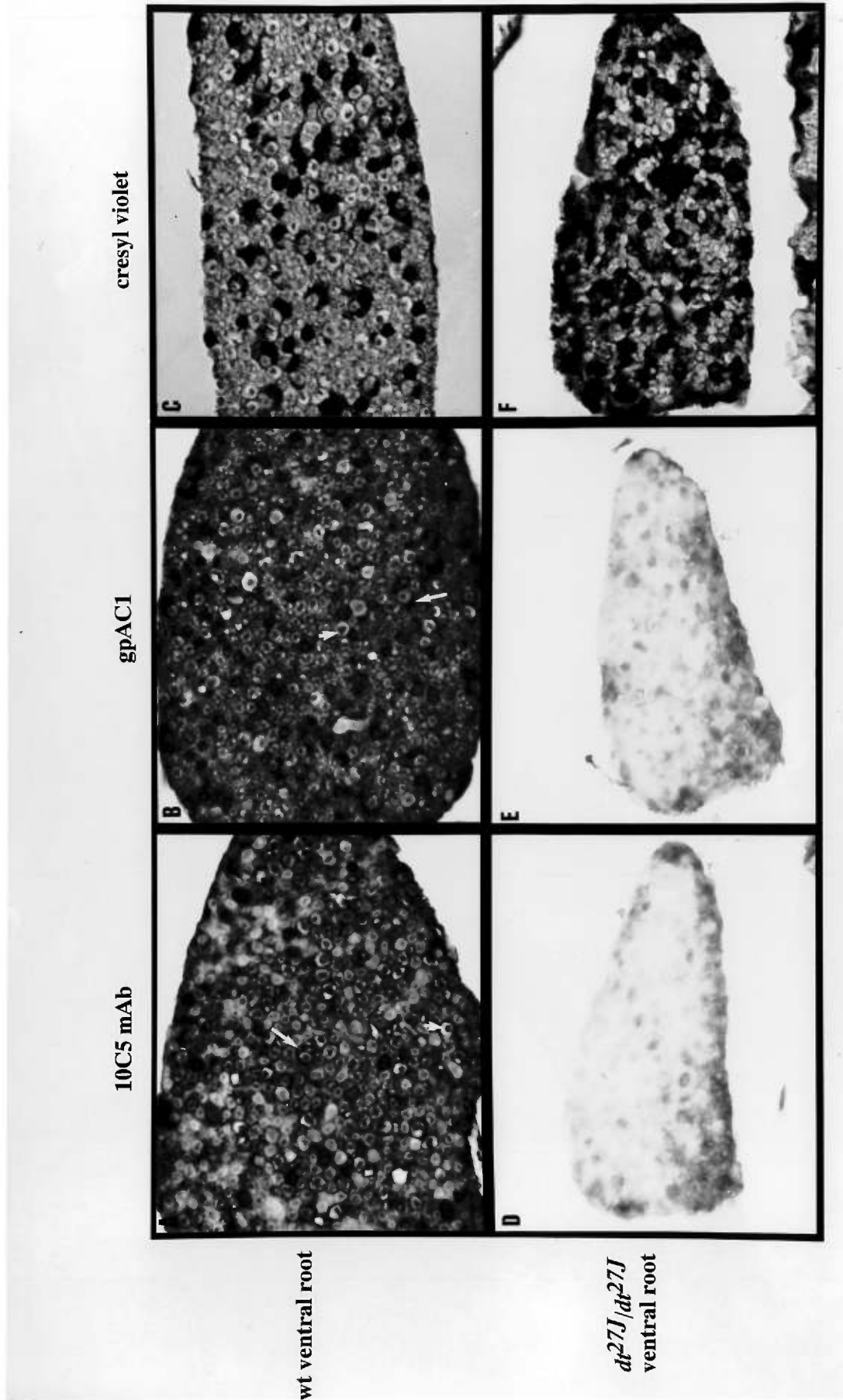


Figure 5. Dystonin is widely distributed in the nervous system. Immunocytochemical analysis of DRG, spinal cord and brain sections, using the 10C5 mAb. *A*, Immunofluorescence on adult mouse DRG cryostat section. A punctate and a diffuse fluorescence pattern is observed in all cell bodies of the neurons. No nuclear staining is observed. Scale bar, 13  $\mu\text{m}$ . *B*, Immunocytochemistry on rat spinal cord vibratome section. A specific DAB labeling is observed in the gray and white matter, and in the cell bodies of neurons in laminae I-VII and IX. Arrows designate positive reaction in  $\alpha$ -motor neurons. Scale bar, 630  $\mu\text{m}$ . *C*, High magnification of the 10C5 labeling in cell bodies and dendrites of lower motor neurons. No nuclear staining is observed. Scale bar, 22  $\mu\text{m}$ . *D*, High magnification photograph showing the labeling obtained with the 10C5 mAb in white matter. This section represents the ventral portion of a section similar to that in (*B*). Note the absence of signal in myelin. Scale bar, 30  $\mu\text{m}$ . *E*, Adult mouse brain vibratome section (50  $\mu\text{m}$ ) was incubated with the 10C5 mAb and bound antibodies were detected using DAB immunocytochemistry. A specific DAB labeling is detected in neurons from the cerebral cortex (c), putamen/caudate (p), hippocampus (h), brain stem (bs) and in cerebellum (cer). Scale bar, 1600  $\mu\text{m}$ . *F*, Higher magnification of the cerebellum from (*E*) shows the DAB labeling in Purkinje (p), granular (g) and molecular (m) cell layers. Scale bar, 740  $\mu\text{m}$ .

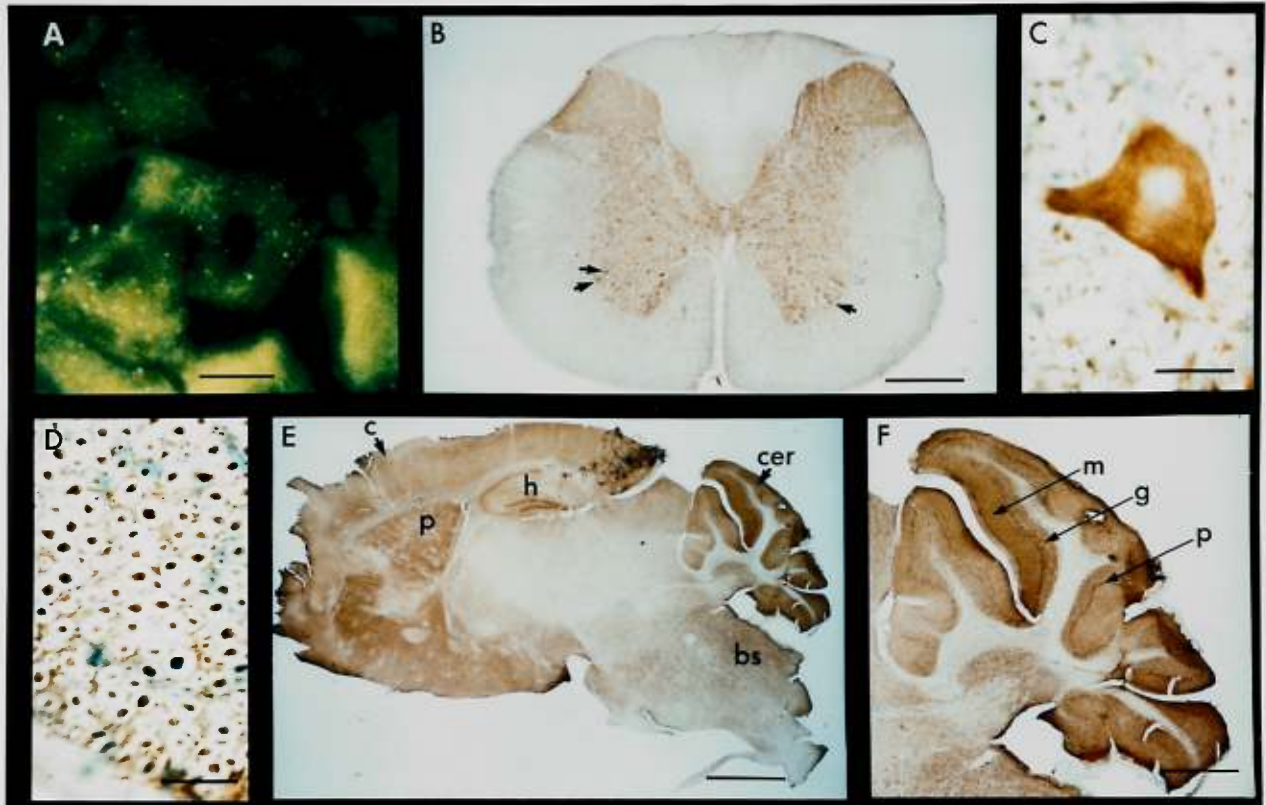
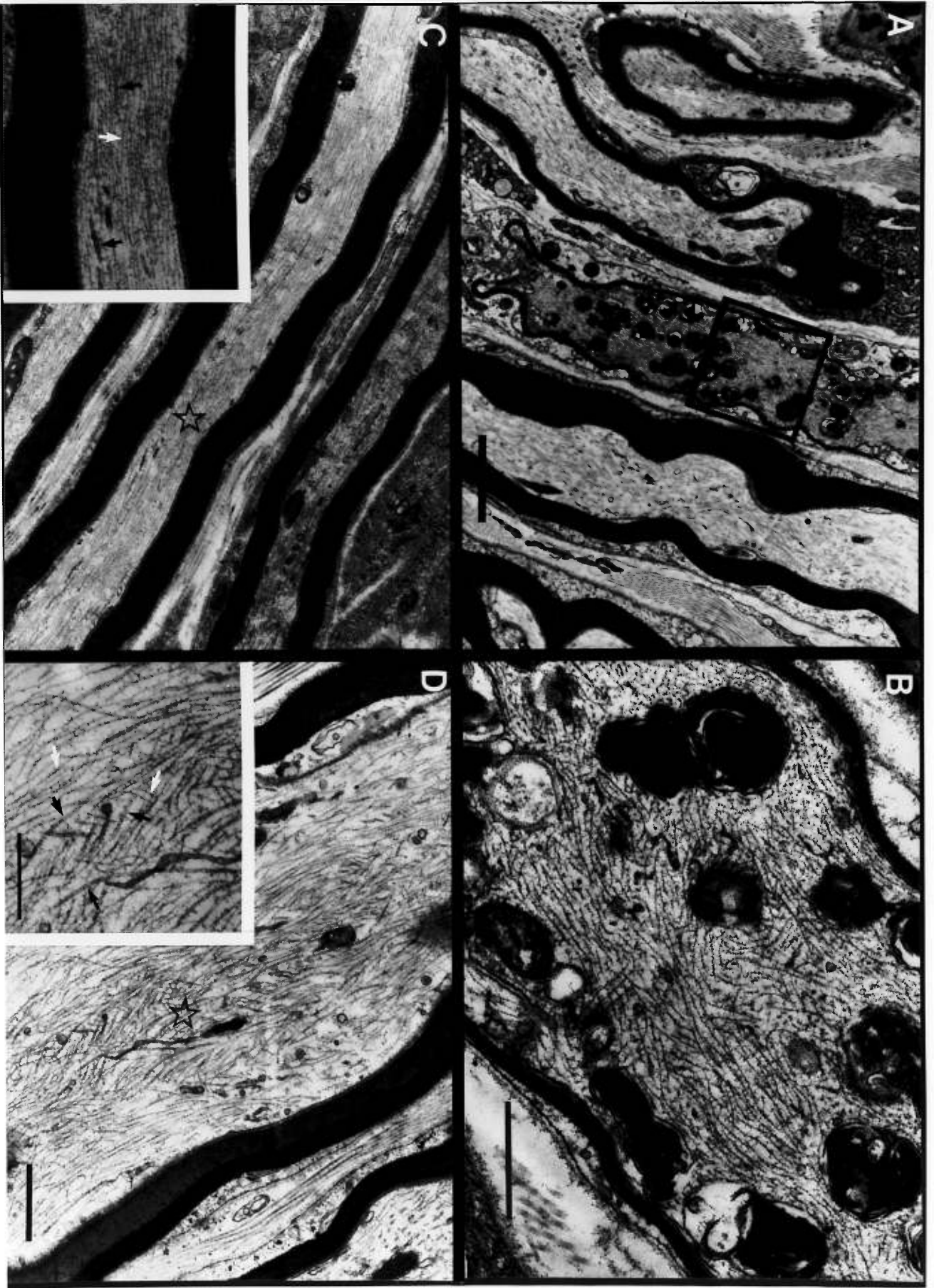


Figure 6. The *dt* neuronal cytoskeleton is disorganized. Ultrastructural analysis of *dt<sup>27J/dt<sup>27J</sup></sup>* dorsal root axons. *A*, An example of a degenerating axon. Note the accumulation of organelles and the demyelination of the axon. The region within the square is shown at higher magnification in *B*. Scale bar, 2  $\mu\text{m}$ . *B*, NF accumulation and disorganization within the degenerating axon shown in *A*. Scale bar, 0.5  $\mu\text{m}$ . *C*, Longitudinal section of dorsal root axons from wild type mice. The region depicted by a star is shown at higher magnification in the inset. Note that the NFs (white arrow) and MTs (black arrows) are oriented parallel to the long axis of the axon. *D*, *dt<sup>27J/dt<sup>27J</sup></sup>* dorsal root axon with no histopathological features except the increased diameter. The region depicted by a star is shown at higher magnification in the inset. Note the disorganization of NFs (white arrows) and MTs (black arrows) when compared to wild type axons. Scale bars for *C* and *D*, 1  $\mu\text{m}$ ; and for the insets, 0.5  $\mu\text{m}$ .



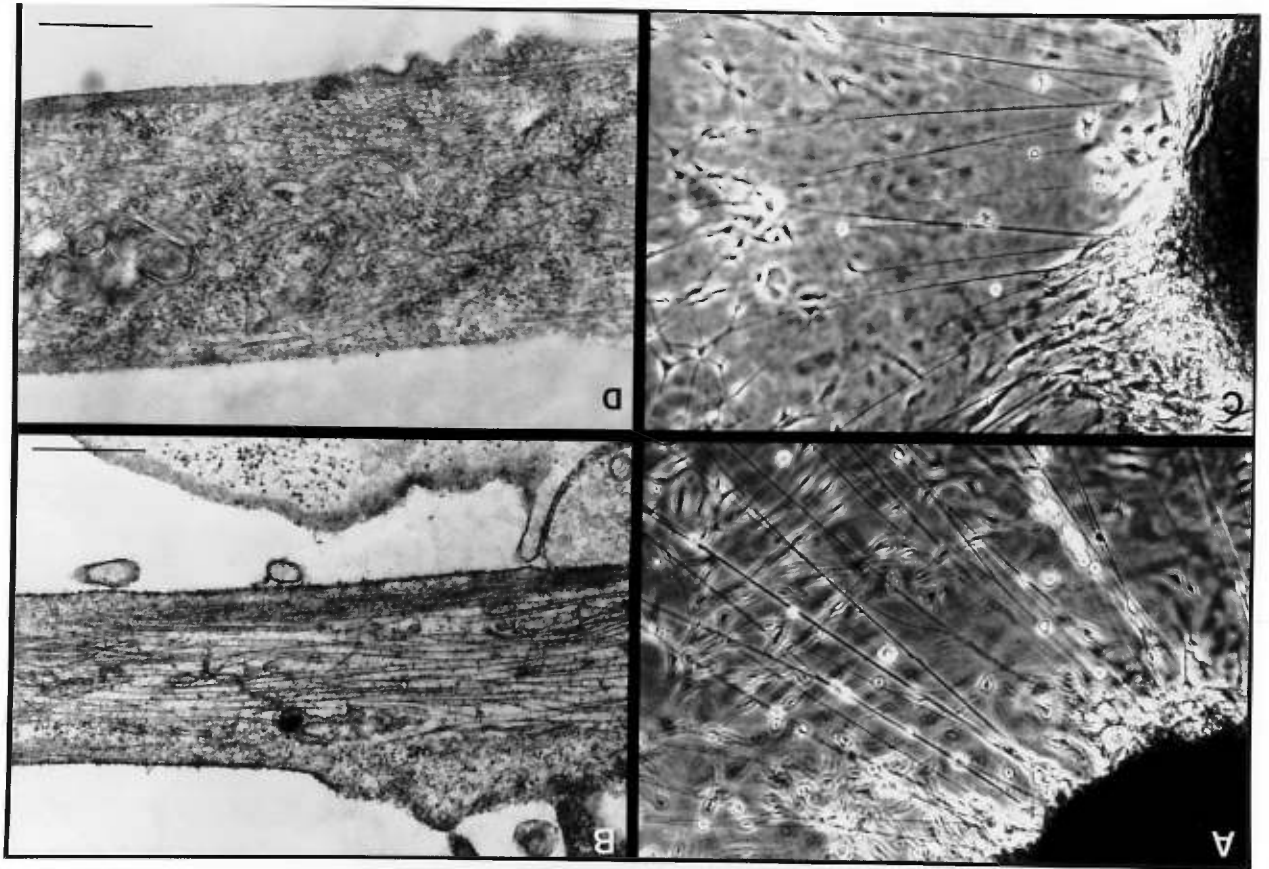


Figure 7. *dt* DRG explants are capable of neurite outgrowth but the cytoskeleton within the neurites is perturbed. Phase contrast microscopy of a wild type (A) and *dtT84/dtT84* (C) DRG explant after 2 days in culture. Neurites are present in both cultures. Original magnification, 400x. B and D, Ultrastructural analysis of wild type and mutant neurites. Note the abnormal organization of NFs and MTs in the mutant neurite (D) when compared to the wild type neurite (B). Scale bars, 0.5  $\mu$ m.

Figure 8. Subcellular localization of dystonin in adult rat spinal cord neurons. Vibratome sections labeled with the 10C5 mAb and the gpAC1 Ab were embedded in resin and observed at the electron microscopic level. *A*, A control section that was not incubated with the primary antibody. *B*, A specific DAB precipitate is observed in myelinated axons after incubation with the 10C5 mAb. The region depicted by a star is shown at higher magnification in the inset. The precipitate is observed on the cytoskeleton. Scale bar for *A* and *B*, 0.5  $\mu\text{m}$ ; and for the inset, 0.13  $\mu\text{m}$ . *C*, Dendrites labeled by the 10C5 mAb. A DAB precipitate is observed on the cytoskeleton. Note the absence of signal in surrounding synapses (*s*). *D*, Dendrites labeled by the gpAC1 Ab. A similar pattern of labeling as that observed with the 10C5 mAb was obtained. Scale bar for *C* and *D*, 1  $\mu\text{m}$ .

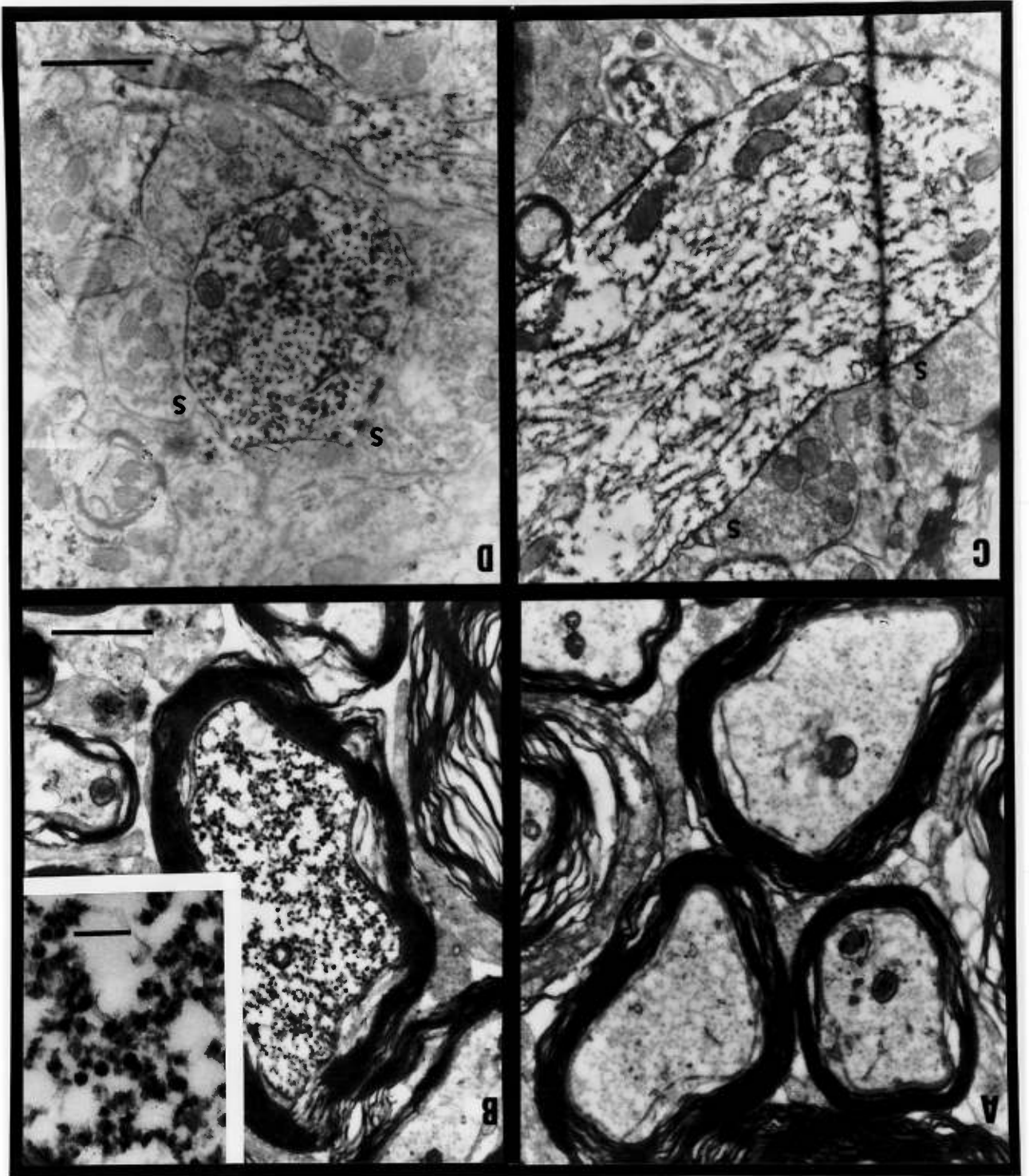
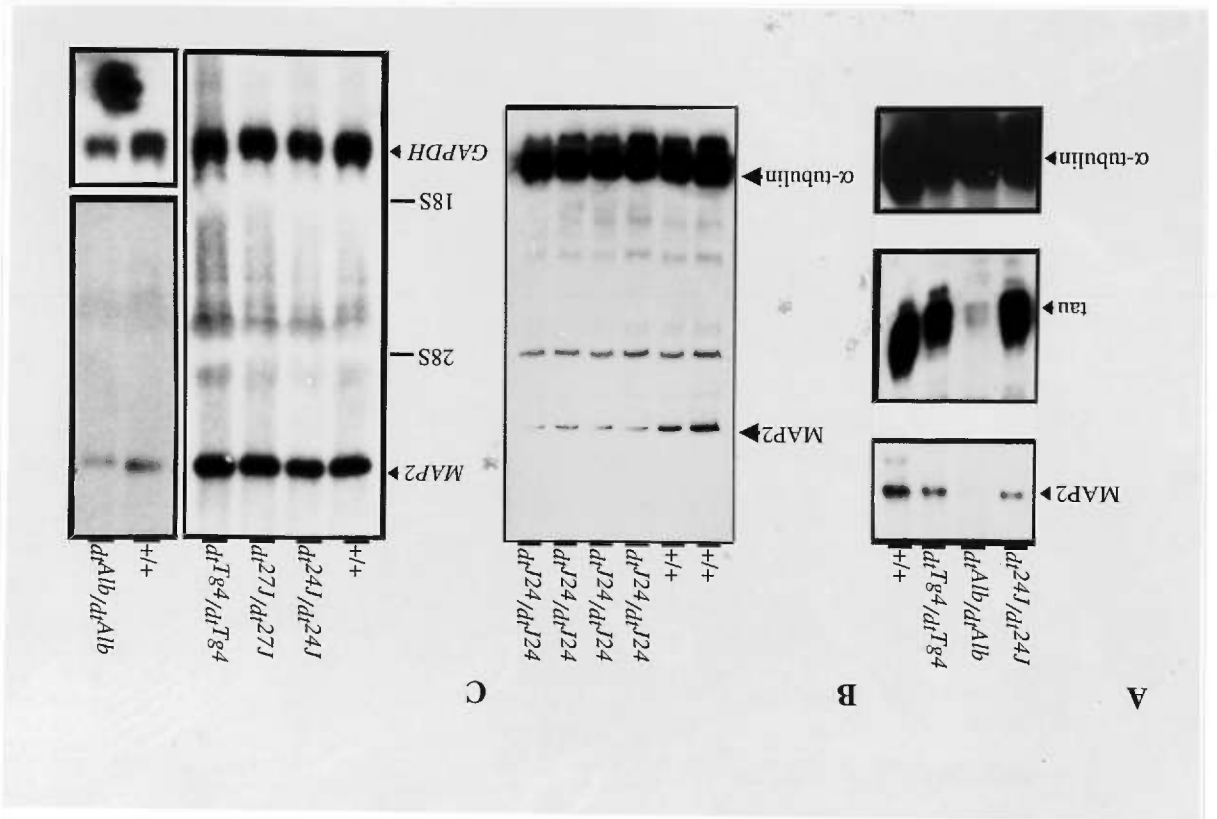




Figure 9. Levels of MAP2 and tau are altered in *dt/dt* spinal cord neurons. A and B, Western blot analysis. A, Spinal cord protein extracts from wild type, *dt<sup>Alb</sup>* and *dt<sup>Tg4</sup>* mice were separated on SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membrane and the blot incubated with antibody 46.1. Bound antibodies were detected with chemiluminescence. The 46.1 mAb detected MAP2 and tau proteins in the wild type (+/+) sample, but the intensity of the bands was decreased in protein samples from *dt<sup>24J</sup>*, *dt<sup>Tg4</sup>* and *dt<sup>Alb</sup>* mice (where almost no signal was detected). The lower panel shows the signal of  $\alpha$ -tubulin observed when the same membrane was re-incubated with anti-tubulin mAb (DM1a). In B, a similar analysis was performed with extracts from wild type and *dt<sup>24J</sup>* mutant mice from the same litter. A decrease in MAP2 levels was consistently observed in all mutant samples. Equal protein loading was confirmed by using an antibody against  $\alpha$ -tubulin. C, MAP2 transcript levels are not altered in *dt* mutants. Northern blot analysis. Total RNA from wild type and mutant brains was resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with a radiolabeled mouse MAP2 cDNA. This probe detects the 9 kb MAP2 and hybridized with a radiolabeled mouse MAP2 cDNA. The same membrane was rehybridized with a GAPDH cDNA probe to confirm equal loading of RNA in each lane. The position of the 28S and 18S ribosomal RNAs are shown.



**Chapitre 3 - Dystonin deficient mice exhibit an intrinsic muscle weakness  
and an instability of skeletal muscle cytoarchitecture**

Gratien Dalpé\*, Martine Mathieu\*, Alain Comtois\*,<sup>‡</sup>, Ercheng Zhu\*, Sylwia Wasiak\*,  
Yves De Repentigny\*, Nicole Leclerc†, and Rashmi Kothary\*,<sup>‡,1</sup>

\*Centre de recherche du CHUM, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1

†Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Québec,  
Canada H3C 3J7

<sup>‡</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Manuscrit soumis à  
Molecular and Cellular Biology  
Janvier 1998

## Summary

*Dystonia musculorum (dt)* was originally described as a hereditary sensory neurodegeneration syndrome of the mouse. The gene defective in *dt*, *dystonin*, encodes a cytoskeleton linker protein. Dystonin has previously been shown to be essential for maintaining neuronal cytoskeletal integrity. In addition to the nervous system, dystonin is expressed in a variety of other tissues including muscle. We now demonstrate that skeletal muscle in *dt* mice is compromised at the physiological and ultrastructural levels. The diaphragm muscle from *dt/dt* mice was weak in isometric contractility measurements *in vitro*, and was susceptible to contraction induced sarcolemmal damage. Ultrastructural studies revealed a disorganization of cytoarchitecture in skeletal muscle from *dt/dt* mice. Myoblasts from *dt/dt* mice fused to form myotubes in culture, however terminally differentiated myotubes contained incompletely assembled myofibrils and they accumulated mitochondria. Dystonin has an actin binding domain (ABD) and an intermediate filament association domain (IFAD). We show here that dystonin has the ability to relocate actin filaments toward intermediate filaments (IFs) and that its levels are increased during myogenesis, coinciding with the progressive reorganization of the IF network. Altogether, our data indicate that dystonin is essential to establish proper cytoarchitecture in mature muscle and to maintain the integrity of muscle fibers.

## Introduction

*Dystonia musculorum (dt)* is a recessive hereditary neuropathy of the mouse. The disease is characterized by progressive incoordination that is first visible between 7 and 10 days after birth. The original characterization of the pathology describes degeneration of nerve fibers in the sensory roots and ganglia of spinal and cranial nerves (Duchen et al., 1963; Duchen and Strich, 1964). A hallmark of the pathology is the accumulation of neurofilaments (NFs), mitochondria and membrane-bound dense bodies in giant axonal

swellings (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964; Janota, 1972). In young *dt* mice, motor neuron innervation and muscle fibers appear normal (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964). In older *dt* mice, loss of nerve fibers is accompanied by atrophy of sensory organs like Pacinian corpuscles and muscle spindles (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964).

The gene responsible for the *dt* disorder was recently identified and named *dystonin* (*Dst*). *Dst* encodes multiple tissue specific transcripts. In the nervous system, two similar neuronal isoforms that differ only in the extreme 5' portion of 15 kb transcripts are expressed (Brown et al., 1995a). Neural *Dst* isoforms encode proteins with an N-terminal actin binding domain (ABD) and a C-terminal intermediate filament association domain (IFAD) (Brown et al., 1995a; Yang et al., 1996). An epithelial isoform is known and has historically been called bullous pemphigoid antigen 1 (Bpag1) (Sawamura et al., 1991; Sawamura et al., 1990). This isoform lacks the ABD and is encoded by a 9 kb transcript. Bpag1 is localized on the inner face of hemidesmosomes where it anchors keratin filaments (Klatte and Jones, 1994). Dystonin/Bpag1 belongs to a family of proteins that associate with intermediate filaments (IFs) in different tissues. These proteins have been collectively referred to as intermediate filament associated proteins (IFAPs) and examples include plectin, desmoplakin, IFAP300, envoplakin and plakoglobin (Green et al., 1992; Ruhrberg et al., 1996; Skalli et al., 1994; Stappenbeck et al., 1993; Wiche et al., 1993). Inactivation of *Bpag1* by gene targeting in mice causes *dystonia musculorum*, fragile skin epithelia and keratin filament dissociation from the inner plate of hemidesmosomes (Guo et al., 1995). Cell culture experiments where NFs and F-actin co-align in the presence of transfected neuronal dystonin also suggest that it functions as a cytoskeleton crosslinker protein in the nervous system (Yang et al., 1996). Dystonin is localized in cell bodies, dendrites and axons of neurons, regions which are rich in the three elements of the cytoskeleton - F-actin, neurofilaments and microtubules (Dalpé et al., 1998). As well, *dt* dorsal root axons and

neurites from ganglia explants contain a disorganized neurofilament network and surprisingly, the microtubule network is also severely disorganized (Dalpé et al., 1998). These studies have suggested that dystonin is not required for establishment of neuronal morphology but that it is essential for maintaining neuronal cytoskeletal integrity.

Different IF molecules are expressed at different stages of cardiac and skeletal muscle development. Nestin is expressed by myoblasts during the earliest stages of myogenesis (Kachinsky et al., 1994). While vimentin is present throughout myogenesis, desmin remains the most abundant IF subunit at the onset of myoblast fusion and in mature myotubes (Gard and Lazarides, 1980; Granger and Lazarides, 1979). IFs are gradually reorganized during myogenesis and in mature muscle fibers, desmin is colocalized with vimentin at the periphery of Z-disks (Gard and Lazarides, 1980; Granger and Lazarides, 1979; Granger and Lazarides, 1978; Schultheiss et al., 1991). Several myopathies are associated with accumulation and disorganization of desmin (Ariza et al., 1995; Horowitz and Schmalbruch, 1994; Vajsar et al., 1993). IFAPs may play a role in organization of IFs within mature striated muscle. Here we have used *dt* mice to evaluate whether dystonin plays a role in skeletal muscle development. We report an intrinsic muscle weakness and an instability of skeletal muscle cytoarchitecture in *dt* mice.

## Materials and methods

### *Animals*

CD1 mice were purchased from Charles River Canada. The *dt<sup>Tg4</sup>* (Brown et al., 1994a; Kothary et al., 1988), *dt<sup>24J</sup>* (Bernier et al., 1995), *dt<sup>27J</sup>* lines have been described before.

### *Measurement of diaphragm contractility*

All procedures were as described before (Q EL Dwairi, 1997). Briefly, mice were anaesthetized and the entire diaphragm was rapidly excised and immersed in a chilled (4°C) equilibrated Kreb's solution for further dissection. A narrow diaphragm strip (3-4 mm wide) was dissected and mounted in a Plexiglass muscle chamber that was immersed in a bath continuously perfused with equilibrated Kreb's solution, which contained 0.15% w/v of Reactive orange 14 (R-8254, Sigma Chemical). The diaphragm strip was left to equilibrate before the central tendon was attached to a micrometer mounted force transducer. The electrical stimulation to elicit isometric tetanic contractions of the diaphragm strip was delivered with a square wave pulse stimulator via platinum electrodes mounted in the muscle chamber. The final stimulation current density, the frequency of single pulses, and the train duration was ~290 mA, 100 Hz, and 600 ms respectively. Isometric forces were normalized in Newton/cm<sup>2</sup>. The peak force (N/cm<sup>2</sup>) was measured for each contraction produced during the course of the experiment. The fatigue protocol consisted of stimulating the diaphragm strip repeatedly with the same stimulation paradigm mentioned above, but at a rate of 2 s<sup>-1</sup> for three minutes.

### *Antibodies*

A guinea pig polyclonal antibody against the N-terminal region of dystonin (gpAC1) has been described (Dalpé et al., 1998). Phalloidin-rhodamine was purchased from Sigma (USA). The antibody against desmin (D3) was purchased from Hybridoma Bank (USA). The biotinylated anti-IgG (guinea pig), the rhodamine conjugated streptavidin, the AMCA conjugated streptavidin and the streptavidin conjugated with 1 nm gold particles were purchased from Jackson Immunoresearch. The biotinylated antibody against mouse IgG was from Vector (Ontario). The peroxidase conjugated streptavidin was obtained from Amersham (Canada). The anti-vimentin antibody and the FITC conjugated

mouse anti-IgG were gifts of Dr. Anne-Marie Mes-Masson and Dr. Yves Raymond respectively.

### *Cell cultures*

The C2C12 cell line was obtained from ATCC (USA). Cells were grown in DMEM containing 10% FBS. When cells reached confluency, the medium was changed for DMEM containing 10% horse serum to induce myogenic differentiation. Primary myoblast cell cultures from newborn mice were established according to the culture conditions of Cusella-De Angelis (1994). Briefly, hind limb muscle was dissected in PBS, transferred into trypsin, cut into small pieces, and incubated at 37°C for 30 minutes. After trituration with a Pasteur pipette, the cells were resuspended in DMEM containing 5% FBS and 3% chick embryo extract, and plated on gelatin coated culture dishes. Myoblasts were allowed to differentiate for 10 days to become contracting myotubes. The same procedure was applied for myoblast cultures of *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* newborn mice. The whole litter progeny of a cross between heterozygous parents were processed the same way. Genomic DNA from each individual was extracted from a tail biopsy and a diagnostic PCR at the *dt* locus was performed to identify *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* mice. For ultrastructural analysis, the culture media was removed and replaced by a fixative containing 0.1 M cacodylate (pH 7.4) and 3.5% glutaraldehyde. Cells were fixed for 30 minutes and processed for electron microscopy.

Myoblasts from a newborn wild type mouse were immortalized according to a protocol modified from Pincon-Raymond (1991). Myoblasts were allowed to adhere to gelatin coated culture dishes for 36 hours in DMEM containing 20% FBS and 1% chick embryo extract. Cells were co-transfected with 1 µg of pSV2NEO and 10 µg of pBAPPYLT (kind gift of Dr. A-M Mes-Masson). The plasmid pBAPPYLT encodes the large T antigen of the polyoma virus under the control of a β-actin promoter. Cells were subjected to G418 selection and individual clones were picked. One of these clones, the

myoA.0 cell line, has the ability to form myotubes in the differentiation medium described above.

### ***Immunohistochemistry***

Immunocytochemistry was performed on cryostat sections of limb skeletal muscle from P15 mice. The sections were permeabilized with 0.3% Triton X-100 and treated with 2 mg/ml sodium borohydride. The gpAC1 antibody was used at a dilution of 1/200. Bound antibodies were detected using a biotinylated anti-guinea pig IgG and streptavidin conjugated horseradish peroxidase. Sections were incubated in DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma, USA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to reveal the peroxidase activity (Harlow and Lane, 1988). Sections were dehydrated and mounted with Permount for light microscopy observation. Immunofluorescence was performed similarly on cells fixed with 4% paraformaldehyde, except that bound antibodies were detected using rhodamine or AMCA conjugated streptavidin. Double antibody labeling experiments using mouse and guinea pig antibodies were performed with biotinylated guinea pig anti-IgG, rhodamine conjugated streptavidin and FITC conjugated mouse anti-IgG. Cells labeled to visualize actin filaments were incubated for one hour with phalloidin-rhodamine according to the manufacturers' instructions. Cells labeled with streptavidin conjugated with 1 nm gold particles were detected using the silver enhancement kit from Amersham (USA).

### ***Histology***

For EM analysis of skeletal muscle, mice were anaesthetized and perfused with fixative containing 0.1 M cacodylate (pH 7.4), 3.5% glutaraldehyde. Skeletal muscle from limb was dissected in the fixative and incubated for 5 hours in the same fixative. Muscles were treated with 1% osmium for one hour, dehydrated and embedded in resin. Sections were collected on grids, stained with lead citrate and observed in EM.



### ***Northern blot analysis***

Approximately 10 µg of total RNA was used in Northern blot analysis as described previously (Brown et al., 1995a). Probes consisted of a cDNA fragment from mouse *Dst* (Brown et al., 1995a), mouse *myogenin* (Edmondson, 1989) and *desmin* (Li et al., 1994) cDNA fragments and the human *GAPDH* cDNA (Tso et al., 1985). Denervation of hind limb muscle was surgically performed on adult CD1 random-bred mice as described (Sedehizade et al., 1997). Denervated mice were allowed to live 4 days before being sacrificed for mRNA extraction in hind limb skeletal muscle. The left hind limb of each mice was denervated and, the right one served as a source for non-denervated skeletal muscle.

### ***RT-PCR analysis***

RNA from hind limb skeletal muscle and cell culture was extracted as described (Brown et al., 1995a). First strand cDNA synthesis was performed using a cDNA synthesis kit from GIBCO-BRL according to the manufacturers' instructions. RT-PCR was performed as described (Bernier et al., 1996). Primers used in this study are: *x*-CTGCTCTAGACAGAGTGAACAAGAGTC; *y*-CTACATGTACGTGGAGGAGCA; *v*-GAGGGCTGTGCTTCGGATAG; *w*-CATCGTTTGCACCAATGCC; *z*-CTGGACTCCCGACTCTAATC.

### ***Protein analysis***

Mouse skeletal muscle was extracted directly in protein sample buffer (Laemmli, 1972). For comparative analysis between mutant and wild type animals, we used phenotype stage and wild type animals of the same age (P15). Equal amounts of proteins (about 50 µg) were separated on a denaturing SDS-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond extra-c, Amersham, Canada) by electroblotting (Harlow and Lane, 1988). Membranes were blocked in PBS supplemented with 3% BSA and

skimmed milk powder at 5% for 3 hours. All antibodies were incubated at room temperature in PBS containing 3% BSA. The gpAC1 antibody, the biotinylated secondary antibodies and streptavidin-peroxidase were incubated for one hour. Immunoreactive proteins were detected with an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham, Canada) according to the manufacturers' instructions.

### ***Green Fluorescent fusion protein***

To generate the construct GFP-ABD, a DNA fragment comprising nucleotides from 368 to 1435 of the sequence under accession number U25158, was subcloned in frame into the plasmid pEGFP-C2 (Clontech). Plasmid GFP-IFAD was generated by subcloning a DNA fragment comprising nucleotides 1470 to 2759 of the mouse *Bpag1* 3' cDNA sequence (Amagai et al., 1990) into the plasmid pEGFP-C2. The GFP-linker construction was generated from the GFP-ABD construct fused with the IFAD described above. The resulting construct (GFP-linker) encodes a GFP-tagged fusion protein comprising of the ABD of dystonin in fusion with the C-terminus of dystonin. All subcloning was performed as described (Sambrook et al., 1988). COS-1 cells were transiently electroporated with these constructs and viewed by immunofluorescence after three days.

## **Results**

### **Skeletal muscles from *dtTg4/dtTg4* mice are weak and fragile**

Diaphragm muscle preparations dissected from *dtTg4/dtTg4* mice and their wild type littermates were used to evaluate the maximum force (MF) generated during isometric contractions *in vitro*. MF generated by diaphragm muscle from P12 wild type mice was averaged at 11.5 N/cm<sup>2</sup>. However, diaphragm preparations from *dtTg4/dtTg4* mice only reached a MF value of 5 N/cm<sup>2</sup> (Figure 1A). An expected force decline was observed in both wild type and *dtTg4/dtTg4* diaphragm preparations in response to a fatigue protocol

(Figure 1A). Force recovered by diaphragm of wild type mice following fatigue reached a value of  $8 \text{ N/cm}^2$ , which represents 70% of the MF (Figure 1B). In contrast,  $dtTg4/dtTg4$  diaphragm preparations never recovered from the fatigue protocol and a continuous force decline was observed (Figure 1B). To assess possible sarcolemmal damage before or after mechanical stress, a low-molecular weight fluorescent dye (reactive orange 14), to which intact muscle cells are impermeable, was added to the Krebs's buffer perfusing the diaphragm muscle preparations before initiation of the fatigue protocol. Before the fatigue protocol, dye uptake by muscle fibers was limited (Figure 1C,E). Dye uptake by damaged muscle fibers was observed after the fatigue phase in both wild type and mutant diaphragm sections (Figure 1D,F). However, a greater number of  $dtTg4/dtTg4$  fibers (19%,  $n=380$ ) incorporated the dye in comparison to wild type fibers (4%,  $n=435$ ). Significant sarcolemmal damage was mostly observed in diaphragm from P15-18  $dtTg4/dtTg4$  mice, which were able to reach a higher MF value (averaged at  $7 \text{ N/cm}^2$ ) than those of P12 mutant mice (data not shown). However, MF generated by diaphragms from these older  $dtTg4/dtTg4$  mice was still lower than that in diaphragm from corresponding wild type mice (averaged at  $18 \text{ N/cm}^2$ ). These data demonstrate that  $dtTg4/dtTg4$  diaphragm muscle is weaker and more susceptible to contraction-induced sarcolemmal damage than that of wild type littermates.

### **Ultrastructural abnormalities in $dtTg4/dtTg4$ skeletal muscle**

Disorganization of muscle cytoarchitecture is a possible explanation for weakness and fragility of  $dtTg4/dtTg4$  skeletal muscle fibers. Haematoxylin-eosin stained sections of hind limb skeletal muscles from P15  $dtTg4/dtTg4$  mice and their wild type littermates displayed no obvious differences (data not shown). This was similar to that reported by others (Dowling et al., 1997) for the *Bpag1*<sup>-/-</sup> mouse. However, electron microscopy (EM) analysis of these tissues revealed the accumulation of mitochondria at the periphery of 45% ( $n=74$ ) of  $dtTg4/dtTg4$  muscle fibers observed in sections (Figure 2B). Peripheral clusters

of mitochondria were never observed in wild type skeletal muscle sections (Figure 2A). Moreover, hypercontraction was observed in  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  longitudinal sections of P15 hind limb skeletal muscle as seen by a 50% reduction in sarcomere length when compared to wild type muscle (data not shown). A similar phenotype was observed in hind limb skeletal muscle from P3  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice (Figure 2C,D). Collapse of cytoarchitecture was observed locally within muscle fibers from P3  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice (Figure 2 D,F,H). This phenotype was never observed in corresponding wild type tissues (Figure 2 C,E). Accumulation of mitochondria at the periphery of muscle fibers was also observed in P3  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice (Figure 2G). Z-disks from  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  muscle fibers appeared thicker than those from wild type (Figure 2 C-F), suggesting that there was accumulation of dense material at these sites.

### **Muscle development is normal in $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$ skeletal muscle**

Neurodegeneration in the sensory part of the nervous system may modulate skeletal muscle development in  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice. On the other hand, mutation in *Dst* could directly influence the initiation of myogenesis in  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice. To evaluate whether there is abnormal muscle development in  $dt^{Tg4}$  mice, hind limb skeletal muscle mRNA levels for *desmin* and *myogenin* were analyzed. *Myogenin* and *desmin* are well known mRNA markers that are still expressed at high levels during neonatal limb skeletal muscle development (Eftimie et al., 1991). *Myogenin* mRNA expression is considerably reduced at P15, and at that stage, its levels are only induced in denervated or regenerating muscle (Eftimie et al., 1991; Fuchtbauer and Westphal, 1992; Sedehizade et al., 1997). In P3 mice, hind limb skeletal muscle RNA levels for *desmin* and *myogenin* were comparable between three different samples from  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  mice and their wild type littermates (Figure 3A). *Myogenin* mRNA levels were induced in adult wild type mice in response to surgical denervation of hind limb skeletal muscle when compared to non-denervated muscle (Figure 3C). In P15 mice, comparably low *myogenin* levels were detected in skeletal

muscle mRNA from three different alleles of *dt* (*dt*<sup>24J</sup>, *dt*<sup>27J</sup> and *dt*<sup>Tg4</sup>) and wild type mice (Figure 3B). Thus the *Dst* mutation and the neuropathy in *dt* mice did not adversely affect muscle development *per se*.

### **Abnormal cytoarchitecture in *dt*<sup>Tg4</sup>/*dt*<sup>Tg4</sup> myotube cultures**

Cells from primary myoblast cultures of both *dt*<sup>Tg4</sup>/*dt*<sup>Tg4</sup> and wild type genotypes fused into multinucleated myotubes after two days of culture, suggesting that mutation in dystonin did not affect myoblast fusion. When cultures were allowed to differentiate for ten more days to become contracting myotubes, wild type myotubes were able to spontaneously contract in culture dishes. By comparison, *dt*<sup>Tg4</sup>/*dt*<sup>Tg4</sup> myotubes displayed only weak contractions. Ultrastructural analysis using EM confirmed the presence of a normal cytoarchitecture in wild type myotubes (Figure 4A). Numerous completely assembled myofibrils were observed (Figure 4A). In contrast, *dt*<sup>Tg4</sup>/*dt*<sup>Tg4</sup> myotubes contained few myofibrils which were incompletely assembled as evidenced by absence of Z-disk material (Figure 4B). Abnormal distribution of mitochondria within *dt*<sup>Tg4</sup>/*dt*<sup>Tg4</sup> myotubes was also observed (Figure 4B). These experiments allow us to conclude that an intrinsic muscle defect, that affects the cytoarchitecture, exists in *dt* mice.

### **Dystonin has a functional actin binding domain**

The ability of the ABD, located in the N-terminal portion of dystonin, to associate with actin filaments was assayed by transfection of a DNA construct encoding this domain fused to the C-terminus of a green fluorescent protein (GFP-ABD). After transient transfection into COS-1 cells, we observed a filamentous cytoplasmic GFP-ABD fluorescence pattern (Figure 5A). Double staining of these cells with phalloidin-rhodamine demonstrated a perfect overlap between GFP-ABD fluorescence and actin stress fibers (Figure 5B). The GFP-ABD fluorescence was not localized in actin-rich ruffling at the cortex of cells (see arrow in Figure 5B). By comparison to the GFP-ABD fusion, the

control GFP expressing vector when transfected into COS-1 cells, resulted in a predominantly nuclear localization (Figure 5C).

### **Dystonin C-terminal domain associates with intermediate filaments**

The C-terminal region of dystonin has a strong similarity with other IFAPs like plectin and desmoplakin (Green et al., 1992). We assayed the activity of this domain in the context of a GFP fusion protein (GFP-IFAD) in COS-1 cells. After transient transfection, a punctate fluorescence pattern distributed in the cytoplasm and also accumulated in the perinuclear area was observed (Figure 5D). This fluorescence pattern was different from the one observed for the control GFP expressing vector (Figure 5C). To investigate a possible association with IFs, these transfected COS-1 cells were subjected to immunolabelling with a vimentin antibody. Interestingly, the fluorescence from the GFP-IFAD protein was mostly restricted to areas of the cell rich in vimentin filaments (compare Figure 5E, F). High magnification views demonstrated that most of the punctate pattern overlapped with vimentin filaments (see examples denoted by arrows, Figure 5E and F) in individual cells.

### **A dystonin mini-gene relocates actin filaments towards IFs**

Transfection studies of full length dystonin demonstrated that this protein has the ability to co-align actin filaments and neurofilaments (Yang et al., 1996). We have fused the IFAD of dystonin to the C-terminal region of GFP-ABD to generate a GFP-tagged dystonin mini-protein (GFP-linker). COS-1 cells transiently transfected with this construct were subjected to immunofluorescence using phalloidin-rhodamine, vimentin and  $\alpha$ -tubulin antibodies. In all expressing cells, we have observed a perfect overlap between the GFP-linker and actin filament fluorescence. Cells expressing low levels of the GFP-linker displayed perfect association with actin stress fibers of normal appearance (similar to Figure 5A), but not with vimentin or tubulin (not shown). Cells displaying strong GFP-

linker fluorescence contained speckled accumulations of the GFP-linker protein, dispersed throughout the cytoplasm as well as in the perinuclear area (Figure 6C). This fluorescence pattern is similar to the one observed with transfected GFP-IFAD (Figure 5D). Surprisingly, actin stress fibers were not present in these cells but actin filaments were rather relocalized into the same sites where we have observed GFP-linker protein accumulation (Figure 6D and high magnification views in Figure 6E,F). Both GFP-linker and actin filaments were co-localized with the vimentin filament network (Figure 6G). Actin stress fiber relocalization was observed in 36% (n=107) of GFP expressing cells; within this cell population 3% of the cells expressed low levels, 22% expressed medium levels and 75% expressed high levels of GFP-linker. No GFP-linker fluorescence was localized at the cell cortex, as observed for the GFP-ABD construct described above. Cortical actin filaments were not reorganized in response to GFP-linker overexpression (Figure 6F). Microtubule and vimentin organization was not affected in these cells (data not shown). Actin filament relocalization was also never observed in COS-1 cells transfected with either the control GFP expressing vector (Figure 6 A,B), GFP-ABD (Figure 5 A,B) or GFP-IFAD (data not shown).

### ***Dst* is expressed in skeletal muscle**

Northern blot analysis of RNA from hind limb skeletal muscle demonstrated the presence of an ~18 kb *Dst* transcript (Figure 7A). This transcript is larger than the neuronal *Dst* transcript (15 kb), and is specific to muscle (Figure 7A). Both 15 and 18 kb *Dst* transcripts were detected in an immortalized mouse myoblast cell line (myoA.0) in which myogenin is highly expressed (Figure 7B,C). A similar hybridization pattern was also observed in non-differentiated C2C12 myoblasts (Figure 7D). Interestingly, levels of the 15 kb transcript decrease as C2C12 myoblasts differentiate into contracting myotubes (Figure 7D). In the nervous system, at least two *Dst* transcripts are present and differ only in their extreme 5' ends (Brown et al., 1995a). RT-PCR analysis using primers specific to

each of these alternate transcripts demonstrated that both isoforms were expressed in skeletal muscle, as well as in the myoA.0 line (Figure 7E). The *dt<sup>Tg4</sup>* mice have a transgene insertion at the *dt* locus that is accompanied by a deletion of 45 kb of host genomic sequences (Brown et al., 1994a). This resulted in deletion of two alternate exons, A and A' (Figure 7E), that are part of the two neuronal *Dst* transcripts (Brown et al., 1995a). RT-PCR analysis on RNA from *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* skeletal muscle was performed and as expected no specific bands were amplified (Figure 7E). RT-PCR primers in exons flanking the deletion of genomic DNA in *dt<sup>Tg4</sup>* were used to assess whether transcripts, in which the transgene insertion was spliced out, were present. RT-PCR bands corresponding to the predicted size and hybridized with a specific internal probe were present only in amplification performed with cDNA from wild type P17 skeletal muscle, *dt<sup>Tg4</sup>/+* primary myotube culture, and myoA.0, but not in cDNA from *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* skeletal muscle and *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* primary myotube culture (Figure 7E). This indicates that in *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* muscle cells, both alternative *Dst* transcripts are affected, and that very few if any transcripts exist that contain exons downstream of the deletion in *dt<sup>Tg4</sup>*.

We have previously described the generation of an antibody against an N-terminal epitope of dystonin (gpAC1 polyclonal antibody) (Dalpé et al., 1998). This antibody specifically identifies dystonin in the nervous system using either immunohistochemistry or Western blot analysis (Dalpé et al., 1998). Using this antibody, a high molecular weight protein was detected in Western blot analysis of skeletal muscle protein extracts from hind limb or diaphragm muscle of wild type mice but not in comparable protein extracts from *dt<sup>Tg4</sup>/dt<sup>Tg4</sup>* mice (Figure 8A). This protein had a slower migration than the one present in spinal cord (Figure 8A) and it was present at lower levels. A Western blot performed with proteins from myoA.0 cells revealed a protein band with a molecular weight similar to the protein identified in skeletal muscle (Figure 8B). In the same extract, a protein with a faster migration was also detected, but its nature remains unknown. This analysis confirms that



*Dst* is expressed in skeletal muscle and in myogenic cell lines at both RNA and protein levels. Deletion of two exons that are part of different muscle *Dst* isoforms, results in loss of RNA and protein expression of *Dst* in *dtTg4* muscle.

### **Dystonin expression coincides with desmin during myogenesis**

Expression of dystonin in myoblasts and muscle was further investigated by immunocytochemistry. C2C12 cells were plated in differentiation media to induce myogenesis. One day after induction of myogenesis, cells were fixed and processed for double antibody immunofluorescence. In a subset of non-fused myoblasts (15%), an induction of desmin was detected (Figure 9A). Interestingly, dystonin levels in these cells were also increased (Figure 9B). In the cells where desmin was not yet induced, dystonin was correspondingly present at low amounts. We have also characterized dystonin expression in the cell line myoA.0, that spontaneously differentiates into myotubes (Figure 9C). In this cell line, high dystonin levels were observed in multinucleated myotubes when compared to non-fused myoblasts (Figure 9D). This analysis was extended *in vivo* to characterize the expression of dystonin in limb skeletal muscle from P15 mice. A peroxidase reaction product within skeletal muscle fibers from wild type mice was detected (Figure 9F) but not in similar sections from *dtTg4/dtTg4* littermates (Figure 9E). A high magnification view of the wild type section shown in Figure 9F revealed a striated peroxidase pattern (Figure 9G).

### **Discussion**

In both epithelial and neuronal cells, mutation of the *Dst* gene results in cytoskeleton disorganization and cellular dysfunction (Brown et al., 1995a; Guo et al., 1995). In this study we provide evidence for weakness and cytoarchitectural abnormalities in skeletal muscle of *dtTg4/dtTg4* mice. An intrinsic ultrastructural defect was observed in

primary myotube cultures from  $dt^{Tg4/dt^{Tg4}}$  mice. Both GFP-tagged N-terminal actin binding and C-terminal IF association domains of dystonin are functional *in vivo*. Moreover, a transfected linker protein comprising both of these two domains relocates actin stress fibers to the IF network. Dystonin and desmin levels are increased simultaneously during myogenesis, and in adult skeletal muscle both of these proteins are localized to Z-bands.

Force generated by  $dt^{Tg4/dt^{Tg4}}$  diaphragm muscle before or after fatigue is considerably lower than that from wild type littermates. The force decline after fatigue suggests that there is an intrinsic structural instability in  $dt^{Tg4/dt^{Tg4}}$  diaphragm muscle, preventing post-fatigue force recovery.  $dt^{Tg4/dt^{Tg4}}$  diaphragm muscle not subjected to mechanical stress did not contain damaged fibers, suggesting that *in vivo*, diaphragm muscle from *dt* mice has little or no damage. In experiments in which a mechanical stress was applied *in vitro* to  $dt^{Tg4/dt^{Tg4}}$  diaphragm muscle, significant damage was observed. These results are similar to those obtained for the diaphragm muscle of *mdx* mice, in which a 5 fold increase of sarcolemmal disruption was observed *in vitro* after contraction-induced stress (Petrof et al., 1993). The only difference is that sarcolemmal damage is observed in *mdx* diaphragm muscle before experimentation, suggesting that some damage is induced *in vivo* (Petrof et al., 1993).

EM observation on skeletal muscle from P15  $dt^{Tg4/dt^{Tg4}}$  mice revealed relocation of mitochondria to the periphery of muscle fibers. Hypercontraction was also observed in all fibers analyzed. Analysis of neonatal  $dt^{Tg4/dt^{Tg4}}$  limb skeletal muscle also revealed a similar phenotype and in addition the presence of a locally disorganized cytoarchitecture, indicating a more severe fragility of muscle fibers. Dystonin, the protein mutated in *dt*, is a cytoskeleton linker between F-actin and IFs. Based on this, we conclude that the above mentioned abnormalities in *dt* muscle are a result of cytoskeleton

disorganization. It is interesting to note that mitochondria have been shown to be associated with Z-disks and that desmin filaments link Z-disks to mitochondria (Tokuyasu et al., 1983a; Tokuyasu et al., 1983b). Vimentin/desmin filaments are also localized between adjacent Z-disks and, between Z-disks and sarcolemma (Granger and Lazarides, 1979; Tokuyasu et al., 1983a; Tokuyasu et al., 1983b). Given this specific localization, muscle IFs are thought to be structural links that maintain the myofibrils stacked together and integrated with the sarcolemma. The hypercontraction and cytoarchitectural disruption observed in *dt* skeletal muscle could have been caused by loss of a linker protein between IFs and F-actin rich areas like the sarcolemma and Z-disks. In keeping with these observations, *desmin* gene targeting in mice has been shown to result in a severe cytoarchitectural defect in cardiac and skeletal muscle (Li et al., 1996; Milner et al., 1996). Histological analysis of different muscle types in *desmin*<sup>-/-</sup> mice suggests that the more active the muscle is *in vivo*, the more severe is the degeneration. Examples of this are the cardiac and diaphragm muscles which are both constantly active, and display frequent degeneration in *desmin*<sup>-/-</sup> mice (Milner et al., 1996). Local disruption of muscle cytoarchitecture was observed in *desmin*<sup>-/-</sup> mice (Milner et al., 1996), as in *dtTg4/dtTg4* mice, suggesting a maintenance role for desmin and dystonin, rather than a role in the establishment of cytoarchitecture. A less severe phenotype is observed in P15 *dtTg4/dtTg4* mice, than in *desmin* knockout mice and P3 *dtTg4/dtTg4* mice, suggesting redundancies of muscle crosslinker proteins may be having an influence in more mature muscle. An actin-IF linker protein that is known to be expressed in mature muscle is plectin. Plectin and dystonin share high sequence similarity throughout their entire coding sequences (Elliott et al., 1997). Mutations in the human PLECTIN gene have been associated with EBS-MD, a disease characterized by skin blistering, muscular dystrophy and desmin disorganization (Chavanas et al., 1996; Errante et al., 1994; Gache et al., 1996; McLean et al., 1996; Pulkkinen et al., 1996; Smith et al., 1996). A targeted mutation in the mouse *plectin* gene has recently been described to result in loss of skin and muscle cytoarchitectural integrity

(Andrä et al., 1997). Interestingly, both dystonin and plectin loss of function, result in a mild skeletal muscle phenotype when compared to the more severe phenotype observed in *desmin*<sup>-/-</sup> mice, as judged by the number of degenerating muscle fibers observed in haematoxylin-eosin stained sections. This may indicate that each of these crosslinker proteins participate in anchoring of IFs in muscle fibers, and that in the absence of one, the other may compensate.

To evaluate a possible involvement for dystonin in myogenesis, we studied primary myoblast cultures from *dtTg4/dtTg4* newborn mice and their wild type littermates. *dtTg4/dtTg4* myoblasts grown for 48 hours formed multinucleated myotubes of normal appearance. This suggests that mutation in *Dst* does not perturb myoblast survival and fusion, and is in keeping with the fact that muscle development proceeds normally up to birth in *dtTg4/dtTg4* mice. Normal expression of muscle development markers like *myogenin* and *desmin* also confirms that myogenesis is initiated normally in *dtTg4/dtTg4* mice. No up-regulation of *myogenin* mRNA levels was observed in skeletal muscle of P15 mice from three different *dt* alleles. This is in contrast to inherited motor neuron degeneration syndromes like *wobbler*, *muscle deficient* and *progressive motor neuronopathy*, where *myogenin* is up-regulated as a result of muscle denervation (Eftimie et al., 1991; Sedehizade et al., 1997). Thus, it appears that the sensory neurodegeneration syndrome of *dt* mice does not result in muscle denervation, at least at two to three weeks of age, and the observed muscle deficiencies are independent of the neuropathy.

*dtTg4/dtTg4* myoblasts allowed to differentiate in culture were never observed to reach the contracting myotube stage. While wild type myotubes were able to spontaneously contract in the culture dishes, *dtTg4/dtTg4* myotubes displayed only weak contractions. In contrast with wild type myotubes, only few myofibrils and a complete absence of Z-disk material was observed in *dtTg4/dtTg4* myotubes. This is indicative of a role for dystonin in

the process of myofibril and Z-disk assembly. Myofibrils are assembled in at least two different steps characterized by  $\alpha$ -actinin containing Z-lines that become oriented laterally and by the subsequent co-localization of desmin with these newly formed myofibrils (Gard and Lazarides, 1980). Another study has reported that myotubes expressing a truncated desmin protein contained a dismantled vimentin/desmin network but, despite this IF defect, displayed normal striated myofibrils (Schultheiss et al., 1991). These studies suggest that IFs are not essential in myofibril assembly. Dystonin and IFs could participate later in this process by maintaining the integrity of assembled myofibrils. Abnormalities of myofibrils and Z-disks are also observed *in vivo* as evidenced by the presence of thick Z-disks and disassembly of myofibrils in  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  skeletal muscle. Mitochondria accumulated in clusters were observed in both  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  myotubes and in skeletal muscle, suggesting that the cytoskeletal disruption in muscle cells also affects mitochondrial distribution. This aberrant mitochondrial accumulation likely results from the impairment of desmin filaments to anchor mitochondria with Z-disks in  $dt^{Tg4}/dt^{Tg4}$  myotubes and skeletal muscle. Therefore, the possibility exists that dystonin and desmin work together to anchor mitochondria to Z-disks since, in *desmin*<sup>-/-</sup> mice, mitochondria organization is lost as well (Milner et al., 1996).

We have confirmed that the ABD at the N-terminus of dystonin associates *in vivo* with actin stress fibers. We have also evaluated the ability of the dystonin C-terminal domain to associate with IFs. This region has been shown to associate with keratin filaments in epithelial cells (Klatte and Jones, 1994), and with neurofilaments *in vivo* and *in vitro* (Yang et al., 1996). We show here that transfected GFP-IFAD is distributed perinuclearly and throughout the cytoplasm, and associated with vimentin filaments in a periodic fashion. Yang et al. (1996) have shown previously that a full length dystonin molecule can co-align F-actin and neurofilaments. We have now shown that a mini-gene construct consisting of both the ABD and the IFAD of dystonin, but lacking the large

internal rod domain, was able to displace actin filaments towards IFs if expressed at high levels. Interestingly, actin filaments were relocalized with the GFP-linker into cytoplasmic particles. The localization of these particles around the nucleus and their distribution in the cytoplasm overlapped with vimentin filaments. In transfected cells with low GFP fluorescence, the GFP-linker was functioning like an actin binding protein only and in this context, actin filament relocalization was not observed.

We have previously reported the expression of a unique 18 kb *Dst* transcript in cardiac muscle (Bernier et al., 1995; Bernier et al., 1996). In the present study, we have extended this analysis and demonstrate *Dst* expression in skeletal muscle and myogenic cell lines. RT-PCR analysis demonstrated that at least two isoforms, represented by alternatively spliced 5' exons A and A' (Brown et al., 1995a; Brown et al., 1995b), are expressed in skeletal muscle. These isoforms are expressed in skeletal muscle from wild type mice but not from *dtTg4/dtTg4* mice. Using a polyclonal antibody against an N-terminal epitope of dystonin (Dalpé et al., 1998), we detected a high molecular weight protein in skeletal muscle from P15 wild type mice but not from *dtTg4/dtTg4* mice. The higher molecular weight of dystonin in muscle may represent additional coding sequence to the polypeptide sequence previously described for the nervous system (Brown et al., 1995a; Brown et al., 1995b), or may be the same polypeptide that is post-translationally modified.

Dystonin expression was characterized during differentiation of C2C12 cells. Soon after the addition of differentiation media, individual myoblast cells start to express desmin. It is known that in myogenic differentiation, vimentin is down-regulated while desmin accumulates (Gard and Lazarides, 1980; Tokuyasu et al., 1984). Dystonin levels were found to be significantly increased in the cells that are induced to express desmin. Dystonin levels are also higher in differentiated myotubes than in non-fused myoblasts in myoA.0

and in C2C12 cell lines. The parallel between desmin and dystonin expression during myogenesis may indicate that dystonin is implicated in terminal differentiation of myotubes and skeletal muscle fibers. Indeed, abnormalities are observed only in terminally differentiated *dtTg4/dtTg4* myotubes. Immunocytochemistry analysis using the gpAC1 antibody showed that dystonin is expressed within wild type skeletal muscle fibers, and not within similar muscle fibers from *dtTg4/dtTg4* mice. Interestingly, the peroxidase signal appears as a striated pattern, suggesting that dystonin is localized in Z-bands. This pattern is similar to the one observed by others with desmin and plectin antibodies in skeletal muscle (Gache et al., 1996). This *in vivo* localization suggest that dystonin is not only co-induced with desmin, but that they may physically interact and in this way, stabilize myofibrils and Z-disks.

Desmin accumulation and disorganization is a common feature of several myopathies and could be part of the initial events in the pathogenesis of these diseases. Since dystonin is a potential organizer of desmin filaments, it is a candidate gene to be mutated in hereditary myopathies and cardiomyopathies where cytoarchitecture disorganization is observed. The skeletal muscle phenotype in *dt* mice is similar to lesions that were observed in a human hereditary myopathy that is characterized by desmin aggregation in skeletal muscle and, by neurofilament accumulation in degenerating peripheral nerves (Ariza et al., 1995). It is then tempting to speculate that a common crosslinker protein, like dystonin, is responsible for disorganization of IFs in both the nervous system and muscle fibers of these patients.

### **Acknowledgments**

We extend our thanks to Dr. Anne-Marie Mes-Masson for the plasmid pBAPPYLT and the vimentin antibody, and to Dr. S-P. Yee for the *myogenin* cDNA probe. We thank

Mr. Luc Lauzière and Mr. Gaston Lambert for excellent photographic work. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada to R.K.. G.D. was supported by a Studentship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, and R.K. and N.L. are Scholars of the FRSQ.

## References

Amagai, M., Hashimoto, T., Tajima, S., Inokuchi, Y., Shimizu, N.; Saito, M., Miki, K., and Nishikawa, T. (1990). Partial cDNA cloning of the 230-kD mouse bullous pemphigoid antigen by use of a human monoclonal anti-basement membrane zone antibody. *J. Invest. Dermatol.* *95*, 252-259.

Andrä, D., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fässler, R., Propst, F., and Wiche, G. (1997). Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes and Development* *11*, 3143-3156.

Ariza, A., Coll, J., Fernandez-Figueras, M. T., Lopez, M. D., Mate, J. L., Garcia, O., Fernandez-Vasalo, A., and Navas-Palacios, J. J. (1995). Desmin myopathy: a multisystem disorder involving skeletal, cardiac, and smooth muscle. *Human Pathology* *26*, 1032-7.

Bernier, G., Brown, A., Dalpe, G., De Repentigny, Y., Mathieu, M., and Kothary, R. (1995). Dystonin expression in the developing nervous system predominates in the neurons that degenerate in dystonia musculorum mutant mice. *Molecular & Cellular Neurosciences* *6*, 509-20.



Bernier, G., Brown, A., Dalpe, G., Mathieu, M., De Repentigny, Y., and Kothary, R. (1995). Dystonin transcripts are altered and their levels are reduced in the mouse neurological mutant dt24J. *Biochemistry & Cell Biology* 73, 605-9.

Bernier, G., Mathieu, M., De Repentigny, Y., Vidal, S. M., and Kothary, R. (1996). Cloning and characterization of mouse ACF7, a novel member of the dystonin subfamily of actin binding proteins. *Genomics* 38, 19-29.

Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J., and Kothary, R. (1995a). The mouse *dystonia musculorum* gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nature Genetics* 10, 301-306.

Brown, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Rossant, J., and Kothary, R. (1994a). The genomic structure of an insertional mutation in the *Dystonia musculorum* locus. *Genomics* 20, 371-376.

Brown, A., Dalpe, G., Mathieu, M., and Kothary, R. (1995b). Cloning and characterization of the neural isoforms of human dystonin. *Genomics* 29, 777-80.

Brown, A., Lemieux, N., Rossant, J., and Kothary, R. (1994b). Human homolog of a mouse sequence from the *dystonia musculorum* locus is on chromosome 6p12. *Mamm. Genome* 5, 434-437.

Chavanas, S., Pulkkinen, L., Gache, Y., Smith, F. J., McLean, W. H., Uitto, J., Ortonne, J. P., and Meneguzzi, G. (1996). A homozygous nonsense mutation in the PLEC1 gene in patients with epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation* 98, 2196-200.

Dalpe, G., Leclerc, N., Vallé, A., Messer, A., Mathieu, M., deRepentigny, Y., and Kothary, R. (1998). Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Molecular & Cellular Neurosciences In Press*.

Dowling, J., Yang, Y., Wollmann, R., Reichardt, L. F., and Fuchs, E. (1997). Developmental expression of BPAG1-n: insights into the spastic ataxia and gross neurologic degeneration in dystonia musculorum mice. *Developmental Biology* 187, 131-42.

Duchen, L. W. (1976). Dystonia musculorum - an inherited disease of the nervous system in the mouse. *Adv. Neurol.* 14, 353-365.

Duchen, L. W., Falconer, D. S., and Strich, S. J. (1963). Dystonia Musculorum. A hereditary neuropathy of mice affecting mainly sensory pathways. *J. Physiol. (Lond.)* 165, 7-9.

Duchen, L. W., and Strich, S. J. (1964). Clinical and pathological studies of an hereditary neuropathy in mice. *Brain* 87, 367-378.

Edmondson, D. G. a. O., E.N. (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 3, 628-640.

Eftimie, R., Brenner, H. R., and Buonanno, A. (1991). Myogenin and MyoD join a family of skeletal muscle genes regulated by electrical activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1349-53.

Elliott, C. E., Becker, B., Oehler, S., Castanon, M. J., Hauptmann, R., and Wiche, G. (1997). Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics* 42, 115-25.

Errante, L. D., Wiche, G., and Shaw, G. (1994). Distribution of plectin, an intermediate filament-associated protein, in the adult rat central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 37, 515-28.

Fuchtbauer, E. M., and Westphal, H. (1992). MyoD and myogenin are coexpressed in regenerating skeletal muscle of the mouse. *Developmental Dynamics* 193, 34-9.

Gache, Y., Chavanas, S., Lacour, J. P., Wiche, G., Owaribe, K., Meneguzzi, G., and Ortonne, J. P. (1996). Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation* 97, 2289-98.

Gard, D. L., and Lazarides, E. (1980). The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell* 19, 263-75.

Granger, B. L., and Lazarides, E. (1979). Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell* 18, 1053-63.

Granger, B. L., and Lazarides, E. (1978). The existence of an insoluble Z disc scaffold in chicken skeletal muscle. *Cell* 15, 1253-68.

Green, K. J., Virata, M. L., Elgart, G. W., Stanley, J. R., and Parry, D. A. (1992). Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin:

members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *International Journal of Biological Macromolecules* *14*, 145-53.

Guo, L., Degenstein, L., Dowling, J., Yu, Q. C., Wollmann, R., Perman, B., and Fuchs, E. (1995). Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* *81*, 233-43.

Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Horowitz, S. H., and Schmalbruch, H. (1994). Autosomal dominant distal myopathy with desmin storage: a clinicopathologic and electrophysiologic study of a large kinship. *Muscle & Nerve* *17*, 151-60.

Janota, I. (1972). Ultrastructural studies of an hereditary sensory neuropathy in mice (dystonia musculorum). *Brain* *95*, 529-36.

Kachinsky, A. M., Dominov, J. A., and Miller, J. B. (1994). Myogenesis and the intermediate filament protein, Nestin. *Developmental Biology* *165*, 216-228.

Klatte, D. H., and Jones, J. C. (1994). Purification of the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BP230) from bovine tongue mucosa: structural analyses and assessment of BP230 tissue distribution using a new monoclonal antibody. *Journal of Investigative Dermatology* *102*, 39-44.

Kothary, R., Clapoff, S., Brown, A., Campbell, R., Peterson, A., and Rossant, J. (1988). A transgene containing *lacZ* inserted into the dystonia locus is expressed in neural tube. *Nature* 335, 435-7.

Laemmli, E. K. (1972). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Li, H., Choudhary, S. K., Milner, D. J., Munir, M. I., Kuisk, I. R., and Capetanaki, Y. (1994). Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *Journal of Cell Biology* 124, 827-41.

Li, Z., Colucci-Guyon, E., Pincon-Raymond, M., Mericskay, M., Pournin, S., Paulin, D., and Babinet, C. (1996). Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Developmental Biology* 175, 362-6.

McLean, W. H., Pulkkinen, L., Smith, F. J., Rugg, E. L., Lane, E. B., Bullrich, F., Burgeson, R. E., Amano, S., Hudson, D. L., Owaribe, K., McGrath, J. A., McMillan, J. R., Eady, R. A., Leigh, I. M., Christiano, A. M., and Uitto, J. (1996). Loss of plectin causes epidermolysis bullosa with muscular dystrophy: cDNA cloning and genomic organization. *Genes & Development* 10, 1724-35.

Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., and Capetanaki, Y. (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *Journal of Cell Biology* 134, 1255-70.

Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., and Sweeney, H. L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 3710-4.

Pincon-Raymond, M., Vicart, P., Bois, P., Chassande, O., Romey, G., Varadi, G., Li, Z. L., Lazdunski, M., Rieger, F., and Paulin, D. (1991). Conditional immortalization of normal and dysgenic mouse muscle cells by the SV40 large T antigen under the vimentin promoter control. *Developmental Biology* 148, 517-28.

Pulkkinen, L., Smith, F. J., Shimizu, H., Murata, S., Yaoita, H., Hachisuka, H., Nishikawa, T., McLean, W. H., and Uitto, J. (1996). Homozygous deletion mutations in the plectin gene (PLEC1) in patients with epidermolysis bullosa simplex associated with late-onset muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 5, 1539-46.

Q EL Dwairi, A. C., Y. Guo and S.N.A. Hussain (1997). Endotoxin-induced skeletal muscle contraction dysfunction: Contribution of Nitric Oxide Synthase. *Am. J. Physiol.* In Press.

Ruhrberg, C., Hajibagheri, M. A., Simon, M., Dooley, T. P., and Watt, F. M. (1996). Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *Journal of Cell Biology* 134, 715-29.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1988). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sawamura, D., Li, K.-H., Chu, M.-L., and Uitto, J. (1991). Human Bullous Pemphigoid Antigen (BPAG1): Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J. Biol. Chem.* 266, 17784-17790.

Sawamura, D., Nomura, K., Sugita, Y., Mattei, M. G., Chu, M. L., Knowlton, R., and Uitto, J. (1990). Bullous pemphigoid antigen: cDNA cloning and mapping of the gene to the short arm of human chromosome 6. *Genomics* 8, 722-726.

Schultheiss, T., Zhongxiang, L., Ishikawa, H., Zamir, I., Stoeckert, C. J., and Holtzer, H. (1991). Desmin/Vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J. Cell Biol.* 114, 953-966.

Sedehizade, F., Klocke, R., and Jockusch, H. (1997). Expression of nerve-regulated genes in muscles of mouse mutants affected by spinal muscular atrophies and muscular dystrophies. *Muscle & Nerve* 20, 186-94.

Skalli, O., Jones, J. C., Gagescu, R., and Goldman, R. D. (1994). IFAP 300 is common to desmosomes and hemidesmosomes and is a possible linker of intermediate filaments to these junctions. *Journal of Cell Biology* 125, 159-70.

Smith, F. J., Eady, R. A., Leigh, I. M., McMillan, J. R., Rugg, E. L., Kelsell, D. P., Bryant, S. P., Spurr, N. K., Geddes, J. F., Kirtschig, G., Milana, G., de Bono, A. G., Owaribe, K., Wiche, G., Pulkkinen, L., Uitto, J., McLean, W. H., and Lane, E. B. (1996). Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nature Genetics* 13, 450-7.

Stappenbeck, T. S., Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Luu, H. H., Virata, M. L., and Green, K. J. (1993). Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filament networks. *Journal of Cell Biology* 123, 691-705.

Tokuyasu, K. T., Dutton, A. H., and Singer, S. J. (1983a). Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle. *Journal of Cell Biology* 96, 1736-42.

Tokuyasu, K. T., Dutton, A. H., and Singer, S. J. (1983b). Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 96, 1727-35.

Tokuyasu, K. T., Maher, P. A., and Singer, S. J. (1984). Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo. I. Immunofluorescence study. *Journal of Cell Biology* 98, 1961-72.

Tso, J. Y., Sun, X. H., Kao, T. H., reece, K. S., and Wu, R. (1985). Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucl. Acids Res.* 13, 2485-2502.

Uitto, J., Pulkkinen, L., Smith, F. J., and McLean, W. H. (1996). Plectin and human genetic disorders of the skin and muscle. The paradigm of epidermolysis bullosa with muscular dystrophy. [Review] [71 refs]. *Experimental Dermatology* 5, 237-46.

Vajsar, J., Becker, L. E., Freedom, R. M., and Murphy, E. G. (1993). Familial desminopathy: myopathy with accumulation of desmin-type intermediate filaments. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 56, 644-8.



Wiche, G., Gromov, D., Donovan, A., Castanon, M. J., and Fuchs, E. (1993). Expression of plectin mutant cDNA in cultured cells indicates a role of COOH-terminal domain in intermediate filament association. *Journal of Cell Biology* *121*, 607-19.

Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q. C., Kouklis, P., Cleveland, D. W., and Fuchs, E. (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* *86*, 655-65.

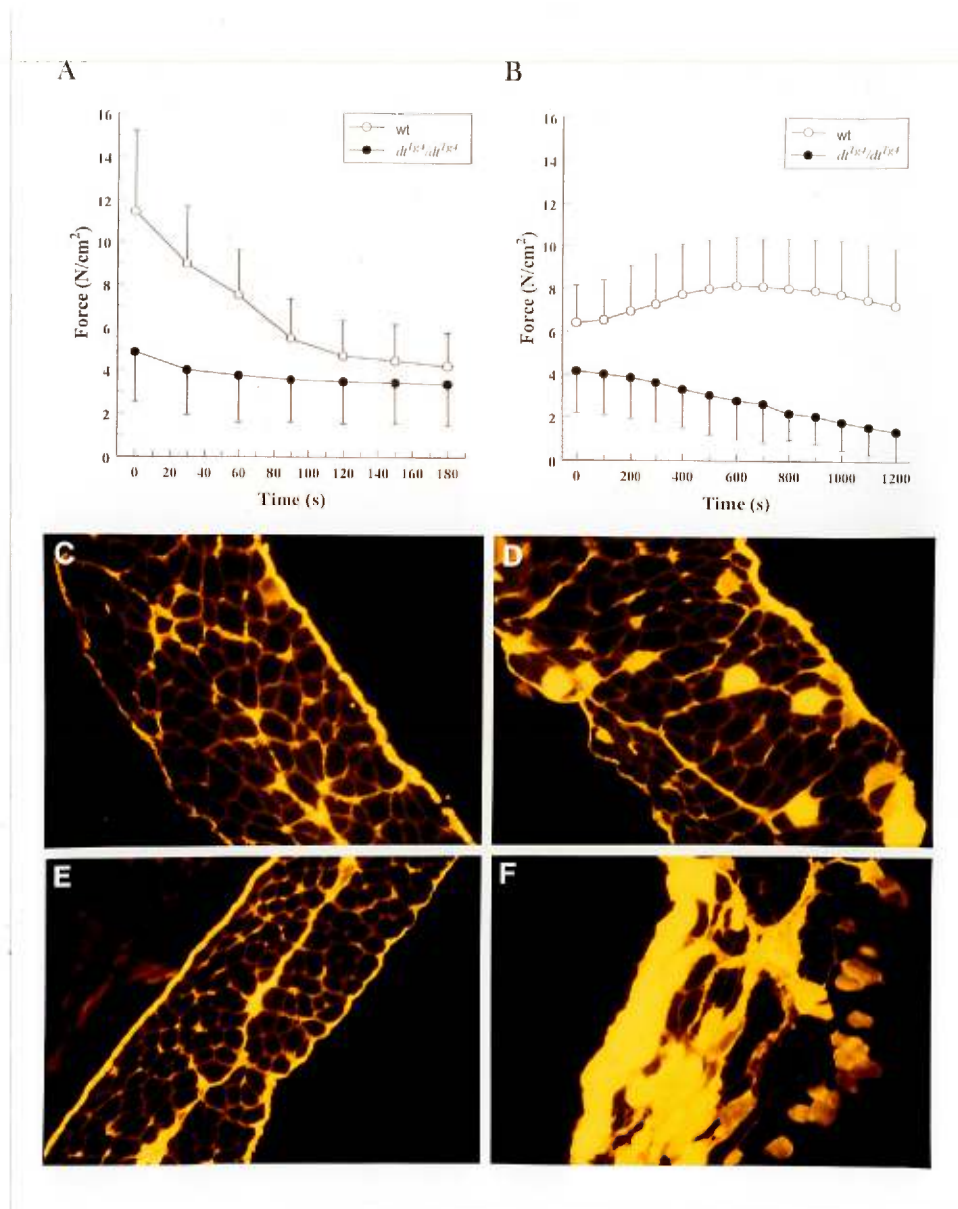


Figure 1. Measurement of diaphragm contractility and of sarcolemmal damage in *dtTg4/dtTg4* mice. Examples of normalized force ( $\text{N}/\text{cm}^2$ ) recorded during the fatigue protocol (A) and in the recovery phase (B) of a contractility experiment performed with P12 *dtTg4/dtTg4* and wild type mice. The normalized force presented on the diagrams are averaged values obtained from two animals of each genotype. All mice were from the same litter. C-F, cross-sections of diaphragm muscle from wild type (C, D) and *dtTg4/dtTg4* mice (E, F) that were perfused with the procion orange fluorescent dye during contractility experiments. Sections from intact diaphragm muscle (C, E) and those taken from the recovery phase (D, F) are shown. Original magnification is 400x.

Figure 2. Cytoarchitectural disruption in  $dtTg^4/dtTg^4$  skeletal muscle. EM sections of hind limb skeletal muscle from P15 wild type (A) and  $dtTg^4/dtTg^4$  (B) mice. An example of clusters of mitochondria accumulated at the periphery of the fibers is indicated by the arrow in B. In C to H, are shown EM sections of hind limb skeletal muscle fibers from P3 wild type (C,E) mice and of their  $dtTg^4/dtTg^4$  (D,F,G,H) littermates. Locally disrupted cytoarchitecture was observed only in  $dtTg^4/dtTg^4$  fibers (D). Reduction of sarcomere length is observed in areas of  $dtTg^4/dtTg^4$  fibers where myofibrils are not disassembled. Sarcomere length in  $dtTg^4/dtTg^4$  fibers (D) is reduced by approximately 50% in comparison with wild type fibers (C). Note the thick appearance of Z-disks in  $dtTg^4/dtTg^4$  fibers (F) in comparison with those of wild type (E). Clusters of mitochondria are also observed in P3  $dtTg^4/dtTg^4$  fibers (arrow in G). Myofibrils are disassembled in  $dtTg^4/dtTg^4$  skeletal muscle fibers (H). Scale bar for A-D and G, 2  $\mu\text{m}$ . Scale bar for E-F and H, 1  $\mu\text{m}$ .

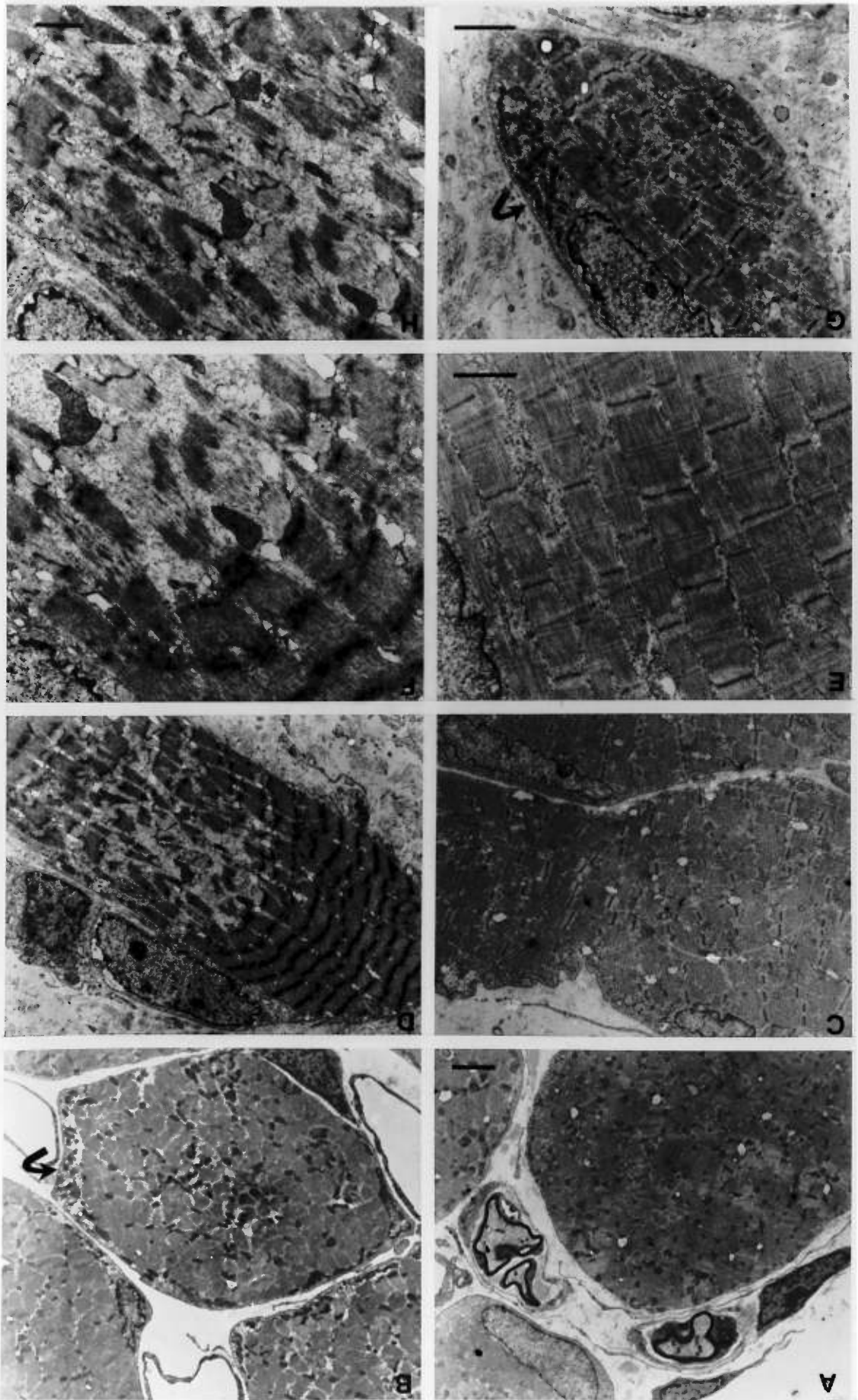


Figure 3. Normal levels of myogenin and desmin mRNA in *dtTg4/dtTg4* muscle. In A, total hind limb skeletal muscle RNA from three different P3 wild type (wt) and *dtTg4/dtTg4* littermate mice was resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with radiolabeled *myogenin* (top panel) and *desmin* (middle panel) cDNA probes. Equal levels for *myogenin* and *desmin* were detected in all RNA samples. In B, total RNA was extracted from hind limb skeletal muscle of P15 wild type (wt), *dt24J/dt24J*, *dt27J/dt27J* and *dtTg4/dtTg4* mice, resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with a radiolabeled *myogenin* cDNA probe (top panel). Equally low levels of *myogenin* mRNA were detected in the four RNA samples. In C, total RNA was extracted from denervated and non-denervated hind limb skeletal muscle of the same mouse, resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with radiolabeled *myogenin* cDNA probe (top panel). High level of *myogenin* mRNA was induced in the denervated skeletal muscle RNA sample (D) in comparison with the non-denervated RNA sample (ND). The same result was obtained when RNA from a second experimental mouse was tested. All blots were rehybridized with a *GAPDH* cDNA to monitor amount of RNA loaded in each lane.

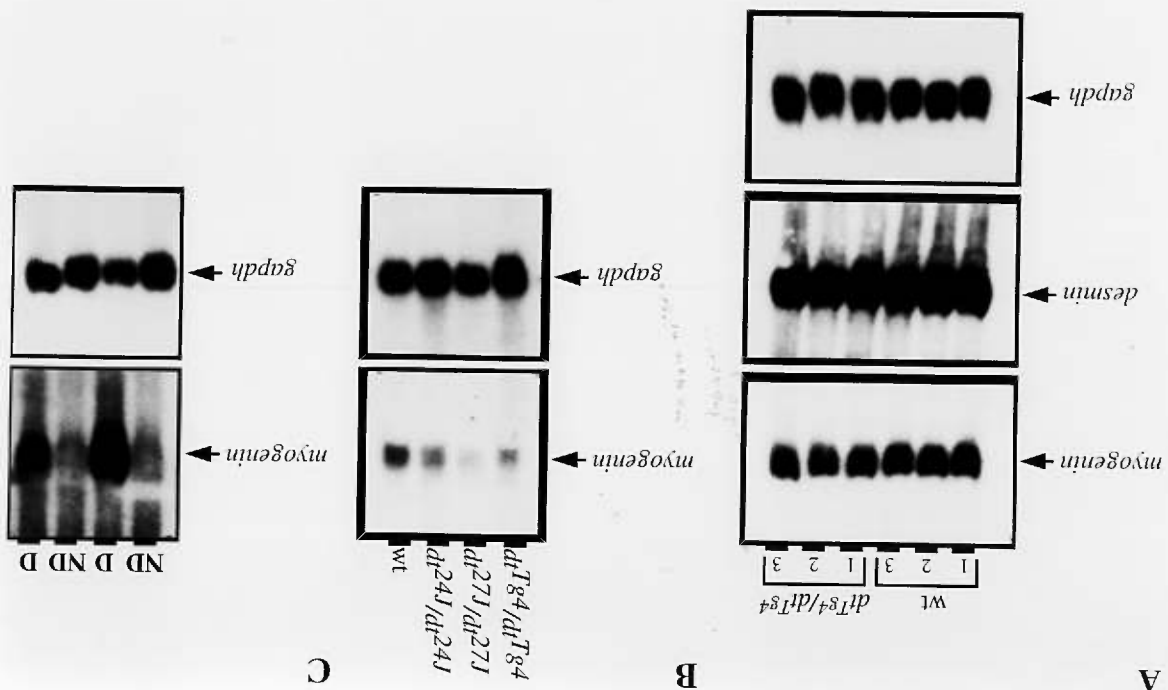


Figure 4. Disorganized cytoarchitecture in *dtTg4/dtTg4* cultured myotubes. Ultrastructural analysis of wild type and *dtTg4/dtTg4* myotubes that were allowed to differentiate for 10 days. Numerous myofibrils are observed in wild type myotubes (A). In the inset of A is presented a high magnification view of myofibrils of normal appearance (region taken from the black square). Note the presence of Z-disks. *dtTg4/dtTg4* myotubes contain few myofibrils and accumulation of mitochondria is frequently observed (B). In the inset of B is presented an example of incompletely assembled myofibril (region taken from the black square). Note the absence of Z-disk material. Scale bar for A and B, 2  $\mu$ m. Scale bar for both insets, 1  $\mu$ m.

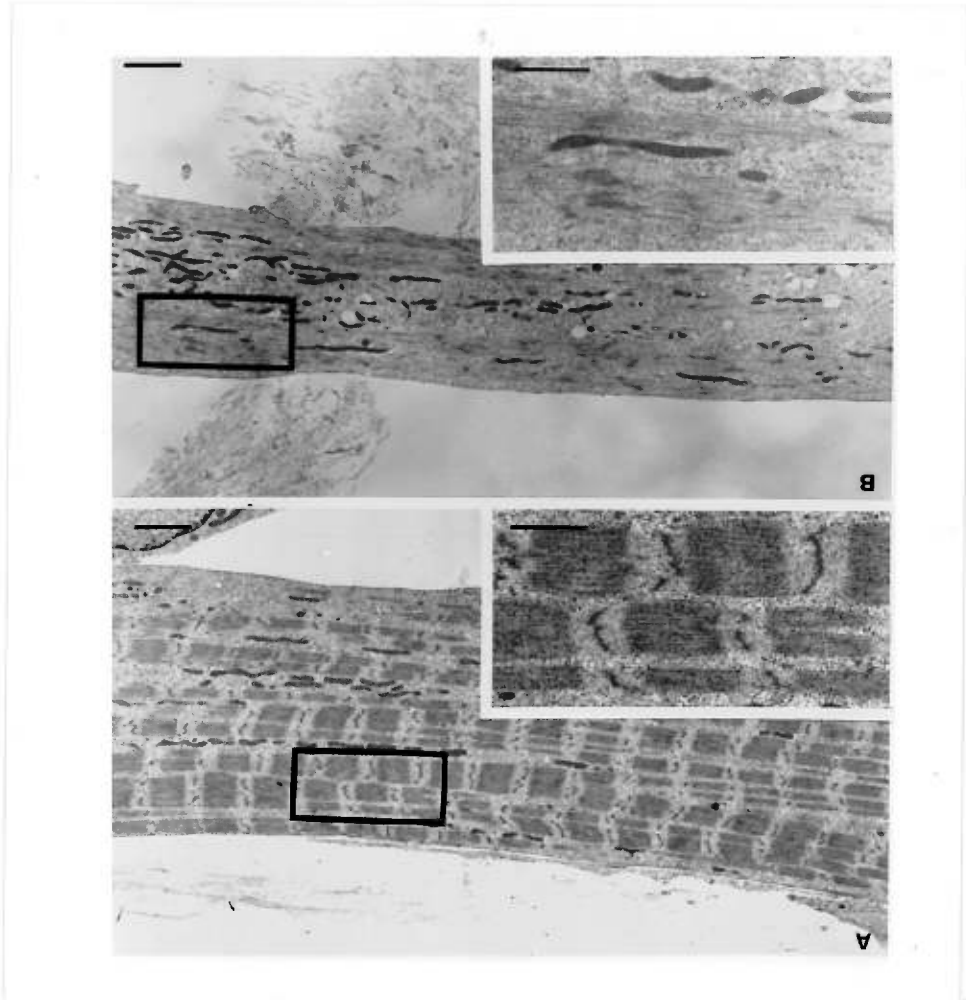


Figure 5. GFP-ABD and GFP-IFAD associate with actin and intermediate filaments respectively. In A and B, COS-1 cells were transiently transfected with GFP-ABD. The endogenous fluorescence from GFP-ABD results in a cytoplasmic and filamentous pattern (A). The same cells were labeled with phalloidin-rhodamine to visualize F-actin (B). A perfect co-alignment of GFP-ABD with F-actin is observed except for the cortex (arrow). Original magnification in A and B is 400x. The control GFP-expressing vector, when transiently transfected in COS-1 cells, results in a predominant nuclear localization (C). In D to F, COS-1 cells were transiently transfected with GFP-IFAD. The endogenous fluorescence from GFP-IFAD appears as a punctate pattern which is distributed throughout the cytoplasm but that is predominant in the perinuclear area (D). High photographic magnification views of the region indicated by the white arrow (in D) are presented in E and F. These cells were labeled using immunofluorescence to visualize vimentin filaments (F). Examples of the punctate fluorescence pattern from GFP-IFAD (E) coinciding with vimentin filaments (F) are denoted by white arrows. The original magnification in C to F is 630x.

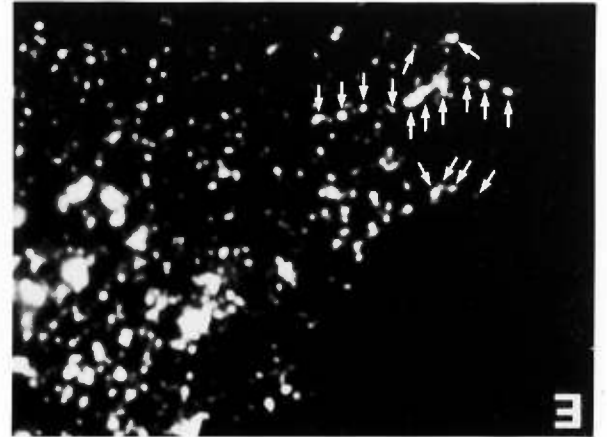
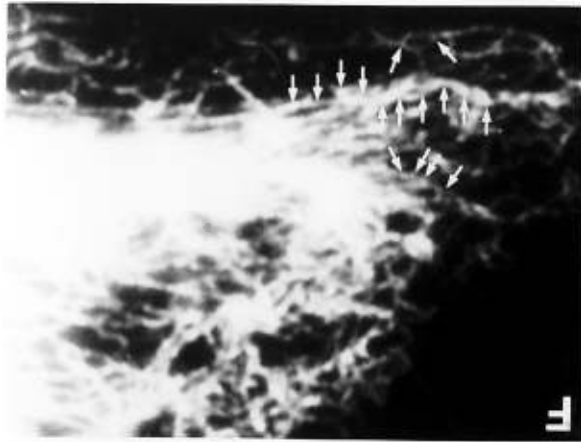
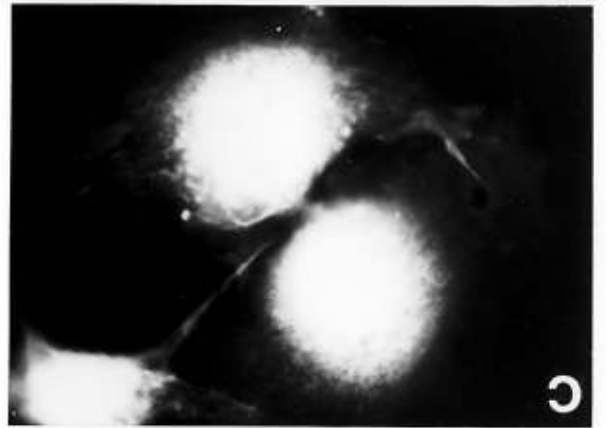
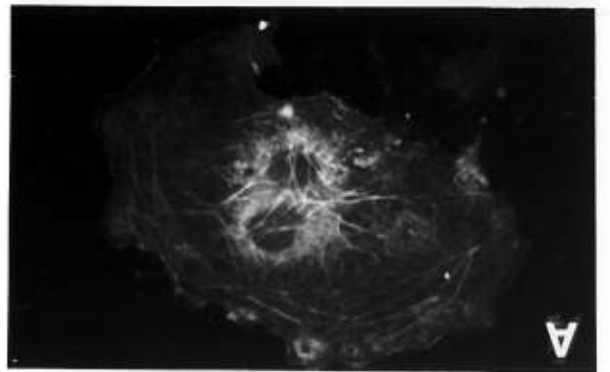
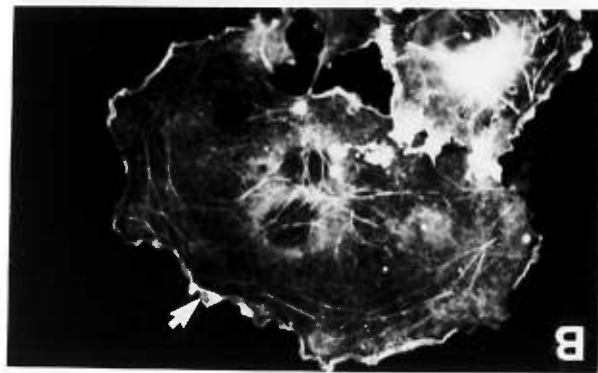




Figure 6. A GFP-tagged dystonin mini-protein (GFP-linker) displaces actin stress fibers to the IF network. Cells in A and B were transiently transfected with the control GFP expressing vector. Expression of the GFP protein does not perturb the organization of actin stress fibers (small white arrows) and cortical actin filaments (large white arrows). In C to G, cells were transiently transfected with GFP-linker and labeled with phalloidin-rhodamine (D, F) and with a vimentin antibody (G). Overexpression of GFP-linker results in a speckled GFP fluorescence pattern that is distributed throughout the cytoplasm and in the perinuclear area (C). Note the high similarity with the fluorescence pattern obtained with GFP-IFAD (in Figure 5D). F-actin associated fluorescence (D) in these cells generally overlap that of GFP-linker (C). High photographic magnification views of the region indicated by the white arrow (in C,D) are presented in E,F. F-actin (F) is localized in the same cytoplasmic sites where GFP-linker (E) is localized. GFP-linker (E) and F-actin (F) are co-localized with the vimentin filament network (examples denoted by arrows in E, F, G). Note that cortical actin filaments are not relocalized to GFP-linker (arrowheads in F). The original magnification is 400x.

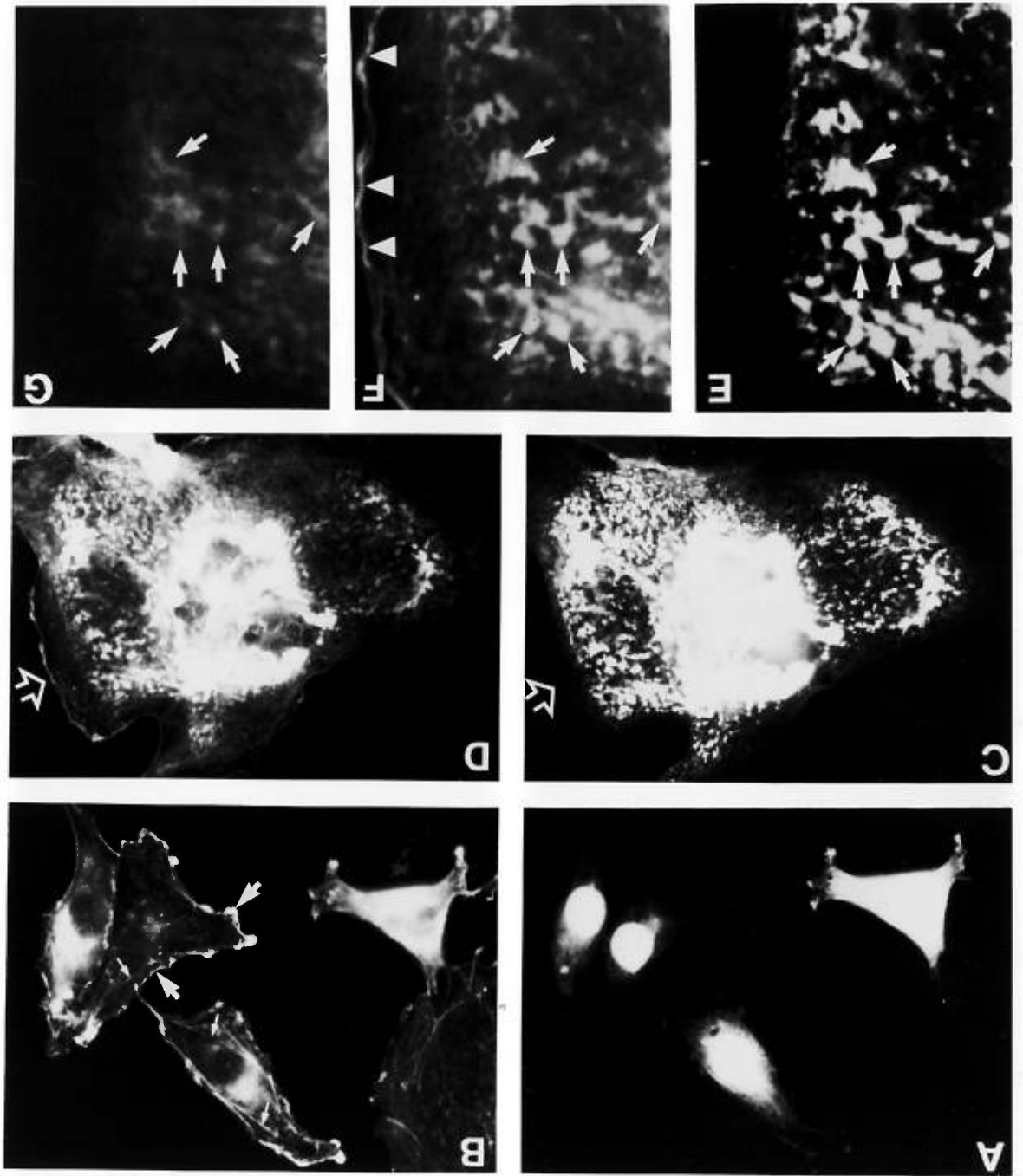
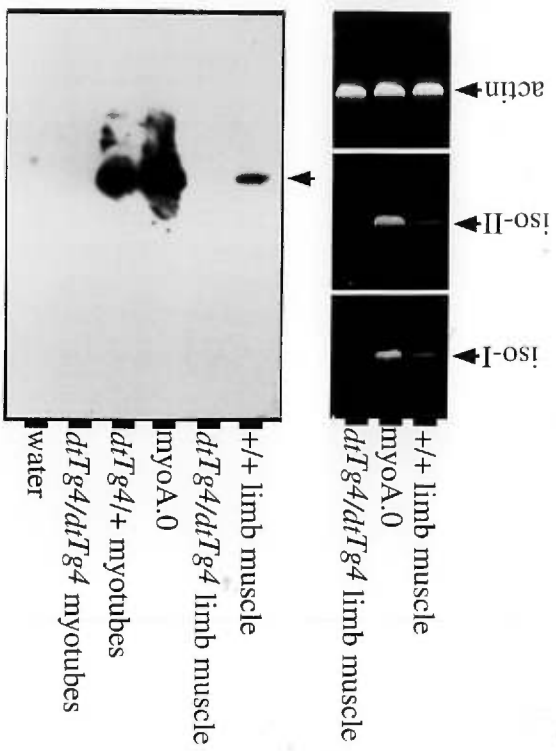
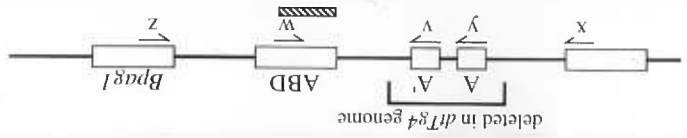
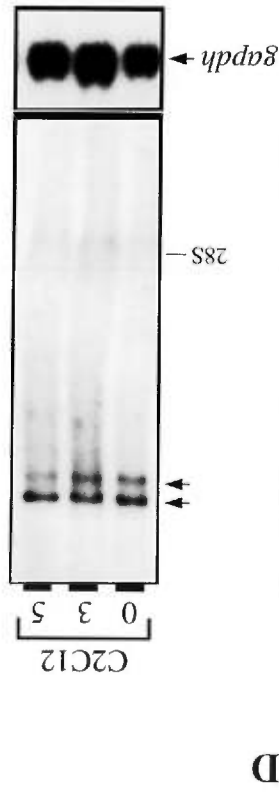
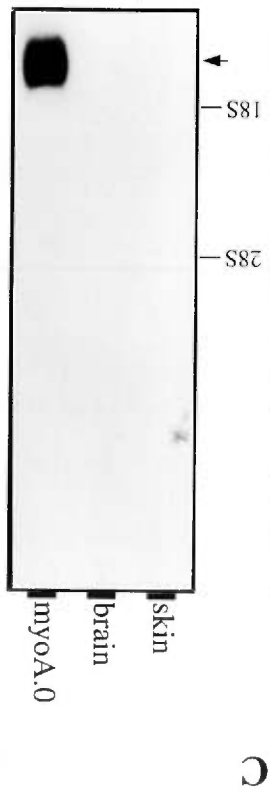
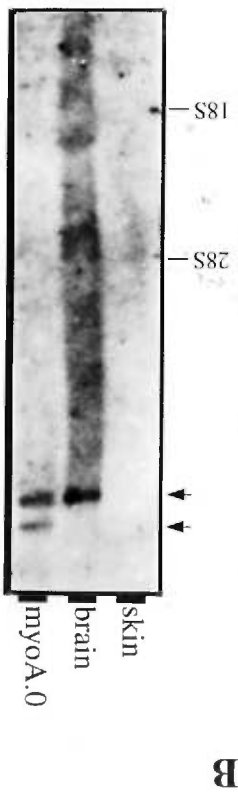
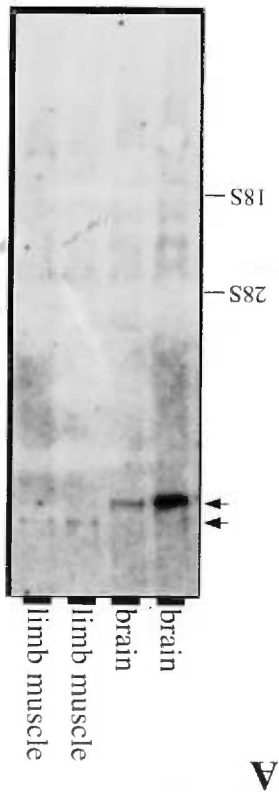


Figure 7. Expression of two *Dst* isoforms in skeletal muscle and myogenic cell lines. In A, total RNA from two samples of brain and hind limb skeletal muscle of wild type mice was resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with a radiolabeled *Dst* cDNA. A 15 kb mRNA is detected in brain RNA samples and a 18 kb mRNA is detected in skeletal muscle RNA samples (arrows). In B, total RNA from skin and brain from a wild type mouse, and from the cell line myoA.0, was resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with a radiolabeled *Dst* cDNA. A 15 kb mRNA is detected in brain RNA but not in skin RNA. However, 15 and 18 kb mRNAs are detected in myoA.0 (arrows). In C, the same membrane was rehybridized with a radiolabelled *myogenin* cDNA probe. *myogenin* mRNA is detected only in myoA.0 (arrow). In D, total RNA from C2C12 cells was extracted at different times during myogenic differentiation (0, 3, and 5 days), resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with a radiolabeled *Dst* cDNA. Both the 15 and 18 kb transcripts are detected in all samples (arrows in top panel). However, the intensity of the 15 kb transcript decreases in RNA from cells differentiated for 5 days. The blot was rehybridized with a *GAPDH* cDNA to monitor amount of RNA loaded in each lane (bottom panel). For A to D, the positions of the 28S and 18S ribosomal RNAs are shown. In E (left panel), cDNA synthesized from total RNA of P15 wild type skeletal muscle, *dtTg4/dtTg4* skeletal muscle and the myoA.0 cell line were used in RT-PCR analysis. PCR amplifications were resolved by agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide. PCR bands corresponding to primers yw (iso-I, *Dst* isoform 1) and vw (iso-II, *Dst* isoform 2) are detected only in amplifications from wild type skeletal muscle RNA and myoA.0 RNA, but not from *dtTg4/dtTg4* skeletal muscle RNA. Each cDNA synthesis was subjected to RT-PCR with  $\beta$ -actin primers to verify the fidelity of the cDNA preparations (actin, left panels). RT-PCR amplification with primers xz was performed on cDNA preparations from P15 wild type mice, P15 *dtTg4/dtTg4* mice, myoA.0, and myotube cultures from *dtTg4/+* and *dtTg4/dtTg4* newborn mice. PCR amplifications were resolved by agarose gel electrophoresis and hybridized with the probe indicated on the map (hatched box, bottom). A PCR band corresponding to amplification with primer xz was detected by the probe only in cDNA amplification synthesized with RNA from skeletal muscle of P15 wild type mice, myoA.0 and *dtTg4/+* myotubes (see arrow, right panel). A control amplification performed with water is shown at the right.



**E**



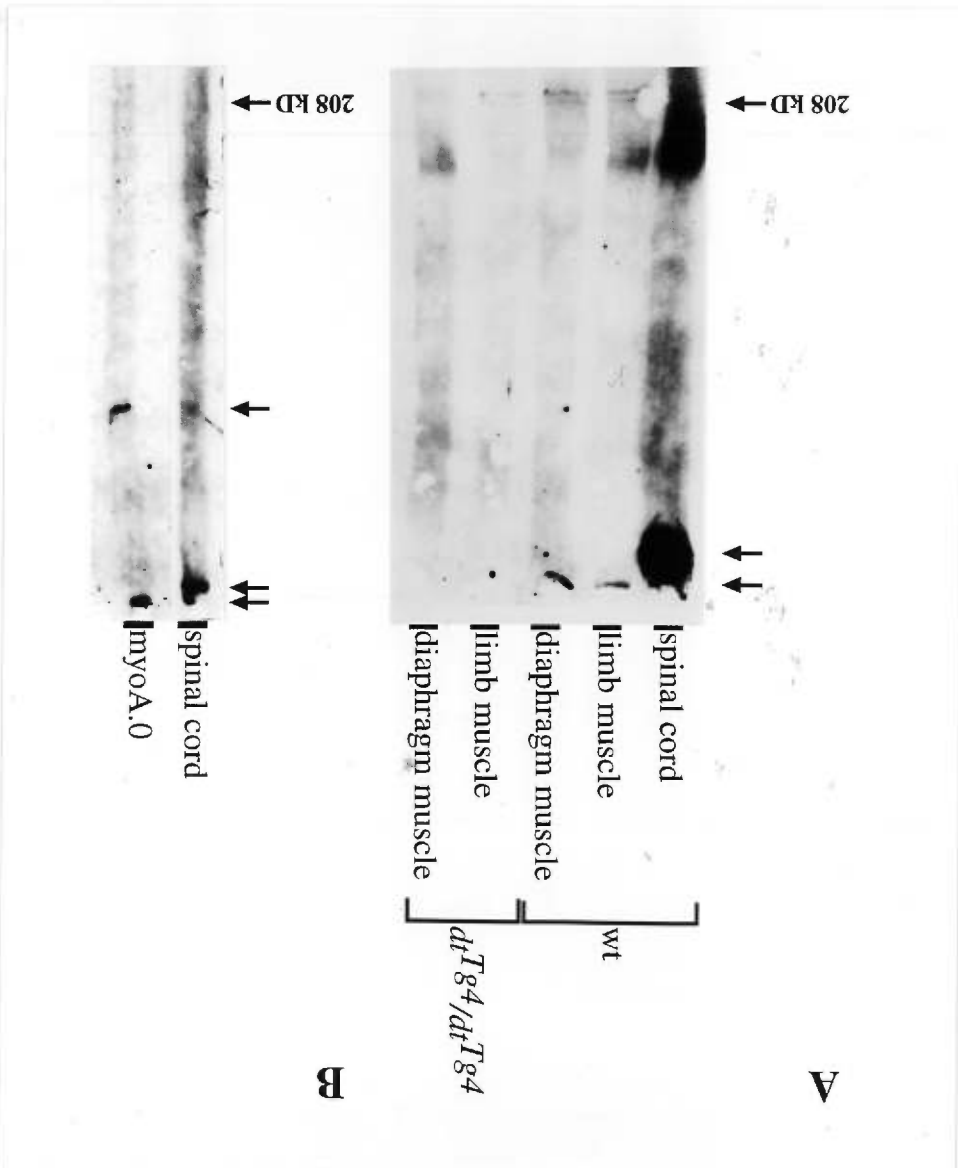
**A**

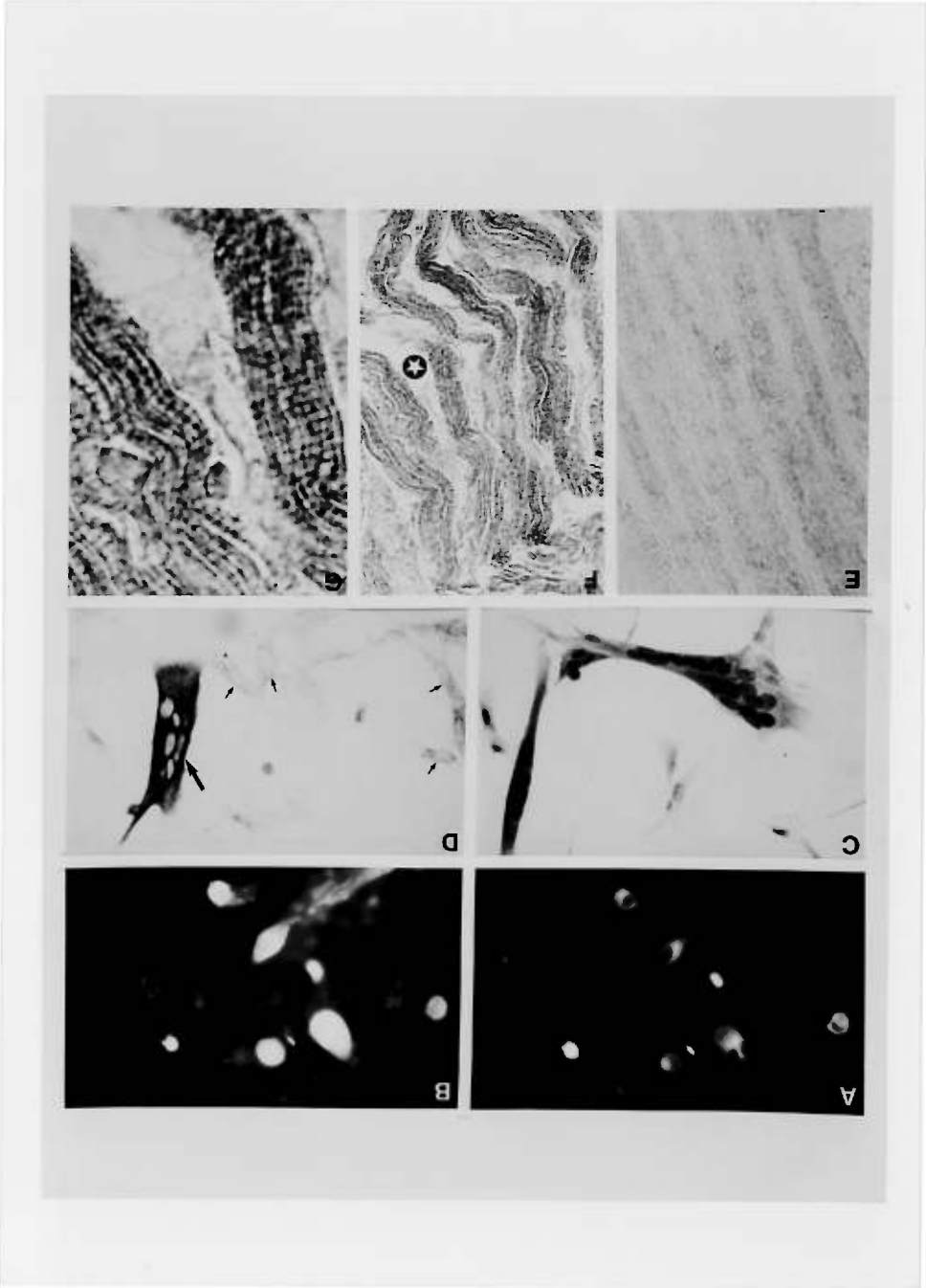
**B**

**C**

**D**

Figure 8. Immunoblot analysis of dystonin in muscle cells. In A, spinal cord, hind limb muscle and diaphragm protein extracts from wild type and *dtTg4/dtTg4* mice were separated on a 3% SDS-polyacrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with the gpAC1 Ab. A high molecular weight band was detected in the wild type spinal cord protein extract and a protein band with a slower migration was detected in wild type skeletal muscle but not in corresponding *dtTg4/dtTg4* muscle (see arrows). In B, a Western blot with gpAC1 Ab was performed with spinal cord protein from a wild type mouse and *myoA.0* protein extract. A protein band similar to the one detected in wild type skeletal muscle was detected in *myoA.0* (arrow). A protein with a smaller molecular weight is also detected in *myoA.0* (arrow). The 208 kD molecular weight marker is indicated.





---

## Chapitre 4 - Discussion

Les souris *dt* sont atteintes d'une maladie neurodégénérative héréditaire *dystonia musculorum*. Le gène muté chez ces souris, la *dystonine (Dst)*, code pour une protéine pouvant effectuer un lien entre l'actine F et les FIs. Les domaines ABD et IFAD de la dystonine sont fonctionnels *in vivo*. De plus, l'actine F est relocalisée vers les FIs dans des cellules exprimant une mini-protéine de la dystonine contenant ces deux domaines. Dans le système nerveux, la dystonine est présente dans l'axone, les dendrites et le corps cellulaire des neurones. Par ailleurs, le réseau de NFs et de MTs est désorganisé à l'intérieur d'axones *dt* provenant de neurones des ganglions des racines dorsales ainsi que dans les neurites de cultures primaires de ces neurones. Ces expériences démontrent que la dystonine est essentielle au maintien de l'organisation du cytosquelette neuronal. La dystonine est également présente dans les muscles squelettiques, dans lesquels elle est associée à l'actine F et aux FIs. Une mutation de la dystonine affecte l'intégrité de l'architecture cellulaire des muscles squelettiques ainsi que celle de myotubes générés en culture cellulaire. Collectivement, nos données suggèrent que les souris *dt* sont atteintes d'un syndrome neurodégénératif et d'un affaiblissement musculaire qui seraient initiés, au niveau moléculaire, par la perte d'un pont inter-filaments reliant l'actine F et les FIs.

### **La dystonine est une protéine qui peut former un pont entre les filaments intermédiaires et les filaments d'actine**

Une protéine de haut poids moléculaire a été identifiée dans des extractions de moelle épinière à l'aide des anticorps gpAC1 et 10C5. L'anticorps gpAC1 cible un épitope dans la portion N-terminale de la dystonine alors que le 10C5 cible un épitope de la portion C-terminale (Figure 2, chapitre 1). Malgré la présence de deux transcrits de *Dst* dans le système nerveux, une seule protéine a été identifiée. Les analyses par Northern blot ne permettent d'ailleurs pas la détection de deux bandes distinctes. Au niveau de l'ARNm,



l'isoforme I de *Dst* est exprimé à des niveaux trois fois moindre que ceux de l'isoforme II (résultat non présenté). Ces observations suggèrent qu'il n'y a peut être pas assez de la protéine dérivée de l'isoforme I pour pouvoir distinguer les deux protéines. Il est également possible que la différence entre les poids moléculaires de ces deux protéines soit inférieure à la résolution de l'électrophorèse sur gel, surtout pour des protéines de cette taille. Cette protéine n'est pas présente dans des extractions provenant de 4 allèles différents de souris *dt*. Ces données corroborent des analyses par Northern blot qui démontrent que pour ces allèles *dt*, les niveaux de *Dst* sont très réduits ou inexistant. Nos résultats suggèrent que les allèles *dt<sup>Tg4</sup>*, *dt<sup>24J</sup>*, *dt<sup>27J</sup>* et *dt<sup>Alb</sup>* ne produisent pas de dystonine fonctionnelle dans le système nerveux.

Nous avons également démontré que la dystonine est exprimée dans les muscles squelettiques adultes. Cependant, des analyses par Northern blot révèlent la présence d'un transcrit de ~18 kb spécifique au muscle squelettique et cardiaque, en comparaison avec celui de 15 kb présent dans le système nerveux. Les deux isoformes de *Dst*, caractérisés par la présence des exons A ou A' à l'extrémité 5', sont exprimés dans des lignées cellulaires myoblastiques. Des transcrits de 15 et ~18 kb sont exprimés dans les myoblastes non-différenciés. Toutefois, les niveaux du transcrit de 15 kb diminuent durant la myogenèse, suggérant que l'expression du transcrit de 15 kb est restreinte aux myoblastes. Une protéine de haut poids moléculaire a été identifiée dans des extractions de muscle squelettique ainsi que dans des lignées cellulaires myoblastiques. Cette protéine n'est pas détectée dans des extractions provenant de souris *dt*. La dystonine des muscles squelettiques migre plus lentement que celle de la moelle épinière sur gel d'électrophorèse, suggérant que des séquences codantes ou des modifications post-traductionnelles sont ajoutées au polypeptide. Cependant, la forme neuronale et musculaire de la dystonine contiennent toutes deux une structure primaire commune, soit un ABD dans la portion N-terminale et un IFAD dans la portion C-terminale.

L'ABD de la dystonine possède une très grande homologie avec celui de plusieurs ABPs. La séquence de ce domaine est également conservée chez la dystonine de l'humain et celle du poulet (annexe 1). Nous avons vérifié l'activité du domaine ABD dans le contexte d'une protéine de fusion GFP transfectée dans une lignée cellulaire épithéliale. La fluorescence émanant de cette protéine de fusion est co-localisée avec les fibres de tension des cellules transfectées. Ces analyses démontrent que ce domaine permet une association avec l'actine F *in vivo*. Ces expériences ont révélé que cette protéine de fusion ne pouvait s'associer avec l'actine F du cortex cellulaire. Cette protéine de fusion est composée de l'ABD ainsi que du domaine codé par l'exon A (Figure 2, chapitre 1). Il est intéressant de noter que la principale différence entre les isoforme I et II de la dystonine réside dans deux petits domaines codés par les exons A et A' en amont l'ABD (Figure 2, chapitre 1). Ces deux exons possèdent une très grande homologie avec leur homologue chez l'humain (Brown et al., 1995b) et chez le poulet (annexe 1), ainsi qu'avec les protéines mACF7 et plectine (Bernier et al., 1996; Elliott et al., 1997). Il est possible que ces domaines puissent réguler la liaison de l'ABD à l'actine F en permettant ou en empêchant cette liaison. Il est également possible qu'ils puissent moduler la spécificité de cette liaison, en permettant par exemple, la liaison à l'actine  $\beta$  ou  $\gamma$  seulement.

En utilisant une stratégie similaire, nous avons voulu déterminer si le domaine C-terminal de la dystonine pouvait s'associer aux FIs. La protéine de fusion GFP-IFAD génère un profil de fluorescence associé de façon ponctuelle avec les FIs. Le domaine C-terminal de la dystonine peut lier plusieurs type de FIs, soit les filaments de vimentine (cellules COS-1), les NFs (Yang et al., 1996) ainsi que les filaments de kératine (Klatte and Jones, 1994). Ce domaine est d'ailleurs très homologue à celui d'autres protéines liant les FIs, soit la portion C-terminale de la plectine et de la desmoplakine (Green et al., 1992). Comme la dystonine, la plectine est elle aussi exprimée dans plusieurs tissus comme le

système nerveux (Errante et al., 1994), les cellules épithéliales ainsi que le muscle squelettique et cardiaque (Gache et al., 1996). Dans ces différents types cellulaires, la plectine est associée à plusieurs types de FIs (neurofilaments, kératine, et desmine). Ces observations suggèrent que le domaine C-terminal de ces protéines s'associe à un domaine conservé parmi les FIs. Il existe une très grande homologie de séquence, parmi les différentes sous-unités des FIs, au niveau de la portion centrale hydrophobe. Ces données suggèrent que l'IFAD de la dystonine pourrait s'associer avec le domaine central des FIs.

Une protéine de fusion (GFP-linker) comprenant l'ABD et l'IFAD, mais manquant la portion centrale de la dystonine, peut relocaliser l'actine F contenue dans les fibres de tension vers le réseau de FIs des cellules transfectées. Cette relocalisation de l'actine F vers les FIs démontre que la dystonine peut agir *in vivo* en tant que pont inter-filaments. Cette activité n'a été observée que dans les cellules exprimant de hauts niveaux de GFP-linker. Dans les cellules contenant peu de GFP-linker, seulement l'ABD était fonctionnel. Ces données indiquent que des hauts niveaux d'expression privilégient l'activité de liaison inter-filaments de cette mini-dystonine. De hauts niveaux d'expression pourraient être nécessaires à la dimérisation de l'IFAD et, ainsi constituer une étape essentielle dans l'association avec les FIs. Ce modèle d'action de la dystonine expliquerait pourquoi lors des transfections avec GFP-IFAD, seulement les cellules exprimant fortement cette protéine de fusion exhibaient une association de GFP-IFAD avec les FIs. À partir des autres cellules exprimant faiblement la protéine GFP-IFAD, il émanait seulement une faible fluorescence diffuse.

Ces expériences suggèrent que la dystonine pourrait, à faible concentration, lier l'actine F seulement. Lorsque la dystonine serait fortement exprimée, elle formerait un pont inter-filaments. Les niveaux de dystonine sont par ailleurs sujets à d'importantes variations durant la différenciation cellulaire. La différenciation des myoblastes en myotubes est

caractérisée par une diminution des niveaux de vimentine et par une forte induction de l'expression de la desmine. Parallèlement, nous avons démontré qu'une induction des niveaux d'expression de la dystonine coïncident avec l'induction de la desmine durant la myogenèse. De plus, la dystonine devient co-localisée avec l'actine F et les FIs dans des myoblastes induit à différencier (annexe 2). Ces observations suggèrent qu'*in vivo*, l'association de la dystonine avec le cytosquelette est dynamique. Plusieurs facteurs, dont les niveaux d'expressions et des modifications post-traductionnelles, pourraient moduler l'association de la dystonine au cytosquelette des cellules musculaires. Les niveaux d'ARNm de *Dst* sont augmentés durant la différenciation neuronale de la lignée cellulaire PC12 (annexe 2). Il est donc également possible que la dystonine s'associe de façon progressive au cytosquelette neuronal. Les neurones du stade adulte seraient, selon ce modèle, plus sensibles à la perte de la dystonine que les neurones embryonnaires.

### **Un rôle pour la dystonine dans le maintien du cytosquelette neuronale**

Chez les neurones, la phase initiale de croissance de l'axone ou l'axonogenèse, est caractérisée par la motilité du cône de croissance ainsi que par la consolidation des neurites. L'axonogenèse implique principalement l'actine F et les MTs (Mitchison and Kirschner, 1988). Chez les souris *dt*, le développement embryonnaire du système nerveux sensitif (Duchen, 1976; Duchen and Strich, 1964; Janota, 1972) ainsi que la phase initiale de croissance des neurites en culture cellulaire se font de façon normale. Cependant, les NFs et les MTs sont désorganisés dans les neurites générées en culture cellulaire par les neurones *dt*. Cette observation est corroborée *in vivo* par la désorganisation des NFs et des MTs dans les axones contenus dans les racines dorsales de souris *dt*. À partir des caractéristiques biochimiques et de la localisation axonale de la dystonine, nous concluons que la désorganisation du cytosquelette dans les neurones *dt* est causée par un défaut intrinsèque du maintien de l'organisation du cytosquelette neuronal. Une mutation de la

dystonine désorganiserait les NFs mais n'empêcherait pas le processus d'axonogenèse. Plusieurs évidences indiquent également que les NFs seraient davantage impliqués dans le maintien que dans la formation du cytosquelette neuronal.

Des souris ayant subi l'ablation génétique du gène *NFL* sont atteintes d'une réduction du calibre axonal ainsi que d'une diminution de la transmission de l'influx nerveux (Fuchs and Cleveland, 1998). Une perte de neurones (15%) a aussi été observée chez les souris *NFL*<sup>-/-</sup> (Fuchs and Cleveland, 1998). Un phénotype similaire a aussi été observé chez les souris transgéniques *NFH-lacZ* (Eyer and Peterson, 1994) et chez le mutant *quiver* de la caille (Yamasaki et al., 1992; Yamasaki et al., 1991). La faible sévérité de ces phénotypes suggère un rôle dans le maintien des axones plutôt que dans leur formation. Un phénotype beaucoup plus sévère afflige des souris transgéniques surexprimant une des sous-unités des NFs (Coté et al., 1993; Lee et al., 1994; Wong et al., 1995; Xu et al., 1993). Les axones de ces souris contiennent des accumulations de NFs dans l'espace perikaryal et dans la partie des axones des neurones moteurs. Ces gonflements sont accompagnés de dégénérescence dans plusieurs fibres nerveuses motrices. Ces observations indiquent que la désorganisation des NFs semble beaucoup plus sévère que la perte de ceux-ci. L'ensemble de ces données suggère que les NFs ne sont pas essentiels à l'axonogenèse et que la perte de l'organisation des NFs dans l'axone peut initier la neurodégénérescence.

Chez les souris *dt*, la neurodégénérescence affecte principalement les axones de gros calibres, laissant intacts ceux de petits calibres (Sotelo and Guenet, 1988). L'abondance en NFs des axones à gros calibre pourrait être impliquée dans cette sélectivité. Dans ces axones, la dystonine organiserait un très grand nombre de NFs. La perte d'organisation de cette grande quantité de NFs causerait l'initiation rapide de la dégénérescence chez les neurones possédant des axones à gros calibre. Le phénotype *dt* est

d'ailleurs retardé chez des souris *dt/dt,NFH-lacZ*, démontrant que l'absence des NFs dans l'axone ralentit le développement de la maladie (Eyer et al., 1998). Cependant, des souris *dt/dt,NFH-lacZ* sont quand même affectées par la neurodégénérescence (Eyer et al., 1998). Ces données suggèrent alors que la désorganisation des NFs n'est pas le seul facteur initiant le processus de dégénérescence des axones *dt*. Les neurones moteurs possèdent des axones de très gros calibres dans les racines ventrales qui ne sont pas affectés par la neurodégénérescence (Duchen and Strich, 1964; Kothary et al., 1988). Pourtant, les niveaux de l'ARNm de *Dst* sont comparables entre les neurones moteurs  $\alpha$  et les neurones sensitifs des ganglions des racines dorsales (Bernier et al., 1995). Des analyses immunohistochimiques démontrent que la dystonine est présente dans plusieurs types de neurones, incluant ceux qui dégènèrent et ceux qui sont épargnés par la neurodégénérescence. Ces observations suggèrent que la protection dont bénéficie les neurones moteurs face au processus de dégénératif est due à la nature différente de ces neurones. Une de ces différences pourrait être la présence d'une protéine homologue à la dystonine, qui serait exprimée dans les neurones moteurs, et qui pourrait compenser pour la perte de la dystonine.

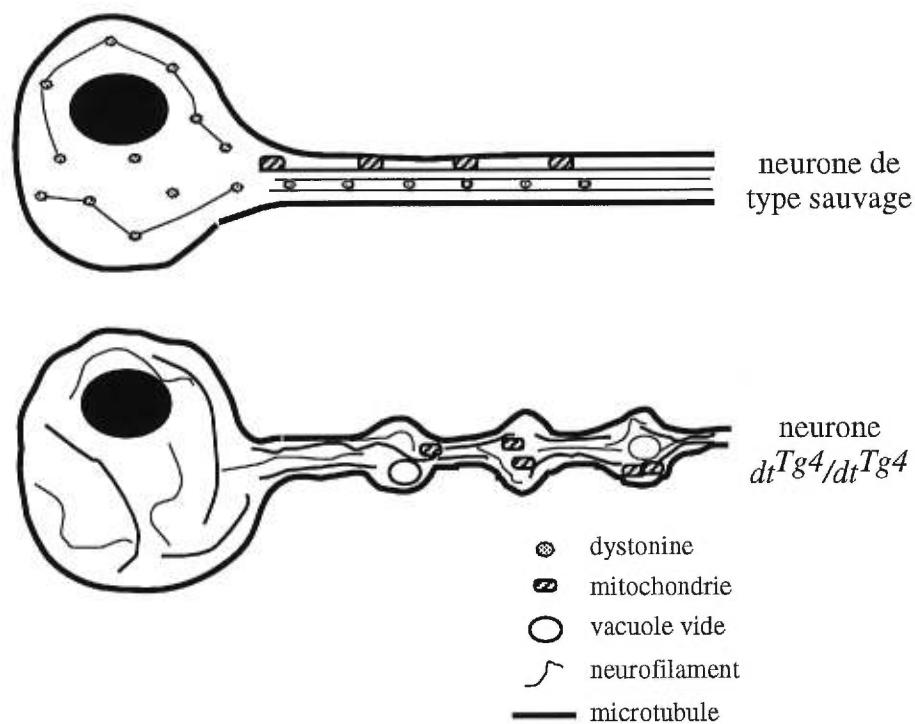
Nous avons observé une désorganisation des MTs ainsi qu'une diminution des niveaux de MAP2 et tau dans les neurones des souris *dt*. Une désorganisation des MTs a aussi été observée dans les neurites *dt* générées en culture cellulaire. Ces observations suggèrent que la dystonine participe au maintien des MTs des neurones. Aucune évidence expérimentale ne suggèrent jusqu'à présent que la dystonine s'associe directement au MTs. Cependant, il a été démontré que dans des cellules épithéliales, la plectine forme des ponts entre les FIs et les MTs et aussi avec l'actine F (Svitkina et al., 1996). Par ailleurs, il a été démontré que la plectine peut lier *in vitro* la spectrine  $\alpha$ , la vimentine ainsi que les protéines MAP1 et 2 (Herrmann and Wiche, 1987). Ces études suggèrent que la plectine est une protéine pouvant s'associer à plusieurs éléments du cytosquelette. Le fait le plus

remarquable est que la plectine possède une très grande homologie avec la dystonine, soit 77% avec la portion N-terminal contenant le domaine ABD (sur 452 acides aminés) et 65% dans la partie C-terminal contenant le domaine IFAD (sur 1429 acides aminés). Basé sur cette très grande homologie de séquence entre la plectine et la dystonine, il demeure possible que la dystonine puisse s'associer aux MTs ou à des protéines associées aux MTs (MAPs). La diminution des niveaux de MAP2 et de tau chez les souris *dt*, pourrait être expliquée par une stabilisation des MAPs par la dystonine. La dégradation des protéines MAP2 et tau s'ensuivrait du démantèlement du réseau de MTs. MAP2 et tau, en plus de s'associer aux MTs, peuvent lier l'actine F (Correas et al., 1990; Kotani et al., 1985; Sattilaro et al., 1981). Il est aussi possible que la liaison de la dystonine à l'actine F de l'axone entraîne la formation d'un complexe comprenant les protéines MAPs et l'actine F.

À partir de nos observations sur la croissance des neurites des neurones *dt* en cultures cellulaire, nous croyons que deux phases principales caractérisent la différenciation neuronale. La première phase serait définie par la motilité du cône de croissance ainsi que par la croissance rapide de neurites à partir du corps cellulaire non-motile. Les NFs entreraient dans ces nouvelles neurites dans une deuxième phase (Lee and Cleveland, 1994) dans laquelle il y aurait intégration de ceux-ci avec les MTs et l'actine F. C'est dans cette phase que la dystonine agirait essentiellement en tant que pont entre les NFs et l'actine F, afin de maintenir l'intégrité du cytosquelette neuronal (Figure 1). La perte de dystonine dans les neurones *dt* laisserait les NFs sans organisation et provoquerait une désorganisation générale du cytosquelette neuronal (Figure 1). La désorganisation du cytosquelette de l'axone s'ensuivrait d'une perturbation du transport axonal ainsi que d'une accumulation de mitochondries et de NFs dans des gonflements axonaux (Figure 1). D'ailleurs une perturbation du transport axonal a été démontrée chez les souris transgéniques surexprimant la sous-unité NFH humaine (Collard et al., 1995). Nous

croions que l'accumulation de ces événements pourrait mener à la dégénérescence de l'axone chez les souris *dt*.





**Figure 1:** Schéma représentant la fonction de la dystonine dans la phase de maintien du cytosquelette neuronal. Après la croissance des axones, les neurofilament entreraient dans l'axone et seraient intégrés aux autres éléments du cytosquelette. La dystonine participerait dans ce processus en associant les neurofilaments à l'actine F de l'axone. La perte de dystonine dans les neurones  $dt$  laisserait les neurofilaments sans organisation et s'ensuivrait une désorganisation générale du cytosquelette ainsi qu'une perturbation du transport axonal.

## **Un rôle pour la dystonine dans le maintien de l'intégrité de l'architecture des muscles squelettiques**

Différentes sous-unités de FIs sont exprimées à des phases distinctes de la myogenèse. La vimentine et la nestine forment les FIs des myoblastes embryonnaires (Gard and Lazarides, 1980; Granger and Lazarides, 1979; Kachinsky et al., 1994). L'expression de la nestine est toutefois restreinte au stade embryonnaire (Kachinsky et al., 1994). Lorsque commence la fusion des myoblastes en myotubes, l'expression de la vimentine diminue alors que l'expression de la desmine se trouve fortement induite (Gard et al., 1979; Gard and Lazarides, 1980; Granger and Lazarides, 1979). Dans les muscles squelettiques, la desmine est localisée à la périphérie des disques Z ainsi qu'entre les myofibrilles et le sarcolemme (Granger and Lazarides, 1979; Tokuyasu et al., 1983a; Tokuyasu et al., 1983b). Basé sur cette localisation particulière, il a été suggéré que la desmine serait responsable du lien entre les myofibrilles ainsi que de l'intégration des myofibrilles avec le sarcolemme. La desmine est aussi liée aux mitochondries et serait responsable de leur ancrage dans les disques Z des muscles striés (Tokuyasu et al., 1983a; Tokuyasu et al., 1983b). À partir de ces données, il apparaît que la desmine est toujours liée à des structures riches en actine F telle que les disques Z et le sarcolemme. Ces observations suggèrent donc que la desmine puisse physiquement s'associer à l'actine F ou qu'une protéine capable d'effectuer un lien entre l'actine F et les FIs soit responsable d'une telle association. La dystonine possède la capacité d'effectuer ce type de lien et pourrait être responsable de l'organisation des FIs dans les muscles squelettiques.

Les deux isoformes connus de *Dst* sont exprimés dans les muscles squelettiques au niveau de l'ARNm et des protéines. Pendant la myogenèse, les niveaux de dystonine sont augmentés en parallèle avec ceux de la desmine. L'association de la dystonine aux FIs et à l'actine F semble progresser durant la myogenèse (annexe 2), coïncidant avec la

réorganisation de ces éléments du cytosquelette durant la phase terminale de la myogenèse. Dans les muscles squelettiques matures, la dystonine est localisée aux disques Z tout comme la desmine. Les muscles squelettiques des souris *dt* n'expriment pas l'ARNm de *Dst* ainsi que la protéine dystonine. Les myoblastes *dt* fusionnent normalement en culture cellulaire, indiquant que cette phase de la myogenèse n'est pas affectée par la perte de fonction de la dystonine. Par contre, les myotubes *dt* formés en culture cellulaire contiennent très peu de myofibrilles, et les disques Z sont absents de ces myofibrilles. Les myofibrilles des fibres musculaires *dt* sont démantelées et contiennent des disques Z élargies, indiquant un défaut dans l'assemblage de ces structures *in vivo*. La dystonine étant une protéine liant l'actine F aux FIs, nous interprétons les anomalies observées dans les fibres musculaires *dt* comme des évidences de désorganisation du cytosquelette musculaire.

Il est intéressant de souligner la très grande ressemblance entre le phénotype musculaire des souris *dt* et celui des souris *desmine*<sup>-/-</sup> (Li et al., 1996; Milner et al., 1996). Les souris *desmine*<sup>-/-</sup> sont affectées d'une dégénérescence sévère du muscle squelettique et cardiaque (Li et al., 1996; Milner et al., 1996). Chez les souris *desmine*<sup>-/-</sup>, la dégénérescence affecte principalement les muscles contractant continuellement tel que le muscle du diaphragme et le muscle cardiaque (Milner et al., 1996). Des analyses ultrastructurales chez les souris *desmine*<sup>-/-</sup> ont permis l'observation d'un démantèlement des myofibrilles dans le muscle cardiaque et squelettique (Milner et al., 1996). De façon analogue, lorsque le muscle du diaphragme de souris *dt* est soumis à un protocole de fatigue *in vitro*, des lésions internes apparaissent à la suite du nombre accrue de contraction. Comme chez les souris *dt*, le démantèlement des myofibrilles chez les souris *desmine*<sup>-/-</sup> n'est observé que localement (Milner et al., 1996). L'ensemble de ces observations indiquent que la desmine et la dystonine ne seraient pas essentielles à la

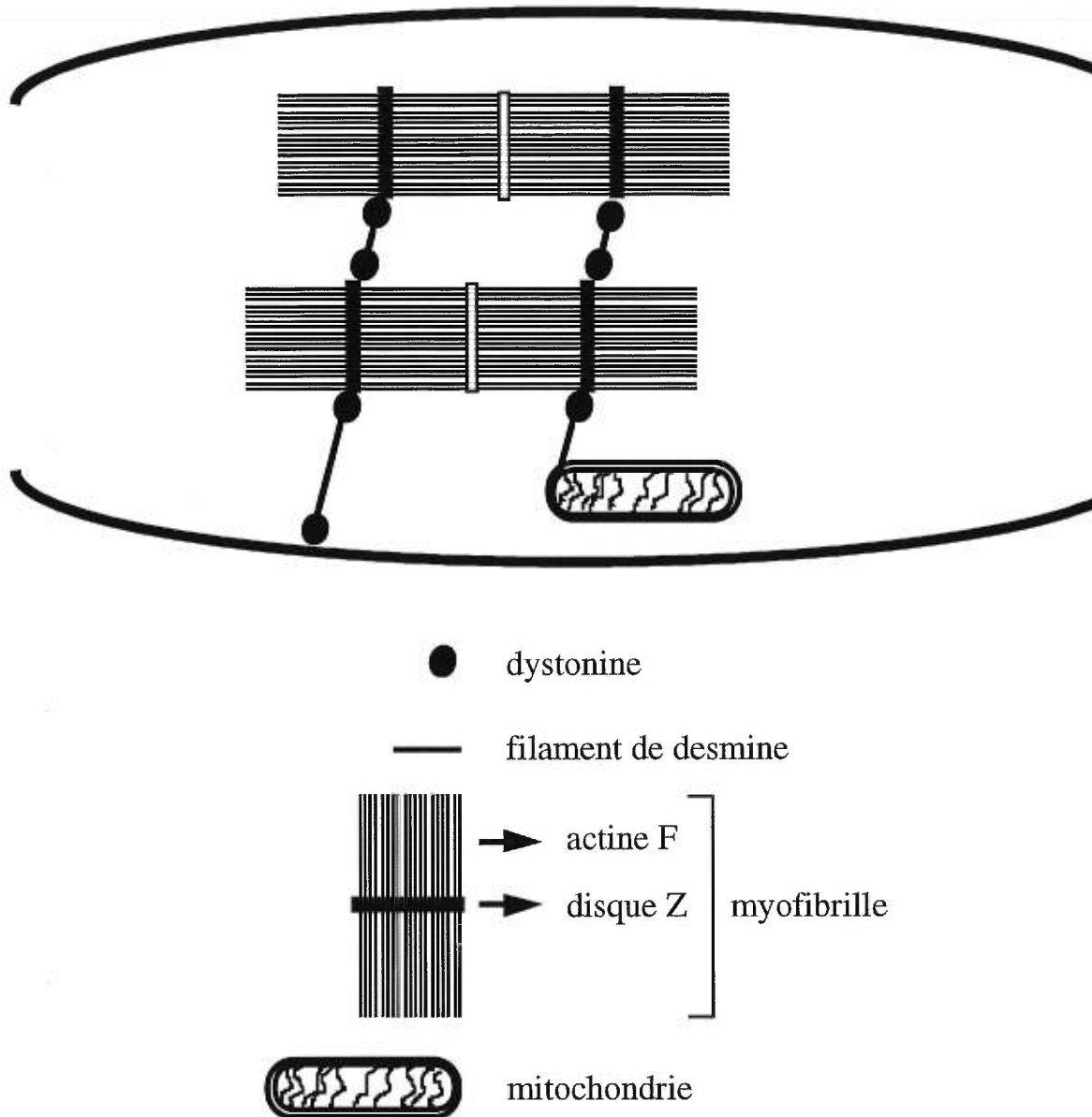
myogénèse ni à la formation des myofibrilles *in vivo*. Toutefois, ces deux protéines seraient responsables du maintien de l'intégrité de l'architecture musculaire.

Les analyses ultrastructurales effectuées à partir de cultures cellulaires de myotubes *dt* ainsi que de muscles squelettiques *dt* indiquent que les mitochondries y sont anormalement localisées. Cette observation a également été faite dans les fibres musculaires des souris *desmine*<sup>-/-</sup> (Milner et al., 1996). Ces données révèlent le rôle essentiel de la desmine et de la dystonine dans l'association des mitochondries avec les disques Z. La dystonine associée à la desmine servirait de lien avec l'actine F des myofibrilles (figure 2). Ce phénomène d'accumulation de mitochondries est un autre signe, qu'un défaut dans le processus d'ancrage des filaments de desmine, existe dans les fibres musculaires *dt*.

Le phénotype observé chez les souris *dt* néonatales est beaucoup plus sévère que chez des souris *dt* adultes. L'architecture cellulaire des fibres musculaires *dt* adultes est normale quoique plusieurs fibres contiennent toujours des mitochondries relocalisées vers la périphérie. En comparaison avec les souris *desmine*<sup>-/-</sup>, le nombre de fibres musculaires dégénérant est considérablement moins élevé chez les souris *dt* (résultats non présentés)(Milner et al., 1996). L'ablation génétique du gène *plectine* murin cause aussi une perte d'intégrité de l'architecture cellulaire du muscle squelettique et cardiaque (Andrä et al., 1997). Toutefois, des analyses histologiques indiquent également que le nombre de fibres dégénérant chez les souris *plectine*<sup>-/-</sup> est très faible (Andrä et al., 1997). Cette comparaison, au niveau de la sévérité de ces phénotypes, suggère que les filaments de desmine sont organisés par plusieurs protéines associées au cytosquelette, entre autres la dystonine et la plectine. L'ensemble de ces données indique que la dystonine et la plectine pourraient toutes deux jouer un rôle cellulaire semblable et qu'en l'absence d'une de ces protéines, l'une pourrait compenser pour l'autre. Dans le muscle squelettique, l'expression de la plectine augmente au cours du développement des muscles squelettiques (résultat non

présenté), suggérant que cette protéine pourrait compenser partiellement la disparition de la dystonine dans des fibres musculaires *dt* adultes.

Ces anomalies des fibres musculaires ont des conséquences au niveau de la force musculaire déployée par les souris *dt*. Le nom *dystonia musculorum* a été initialement donné à cette maladie en raison du faible tonus musculaire exhibé par les souris *dt*. Une partie du phénotype *dt*, les spasmes musculaires des membres et du tronc, pourrait être expliquée par cette faiblesse musculaire. Le muscle du diaphragme des souris *dt* génère une force moindre que le diaphragme de souris normale, indiquant qu'il pourrait y avoir certaines répercussions sur la capacité respiratoire des souris *dt*. Les souris *dt* meurent généralement avant la maturité sexuelle et ce phénomène pourrait être dû, à la lumière de ce défaut des fibres musculaires, à une insuffisance cardiaque ou respiratoire.



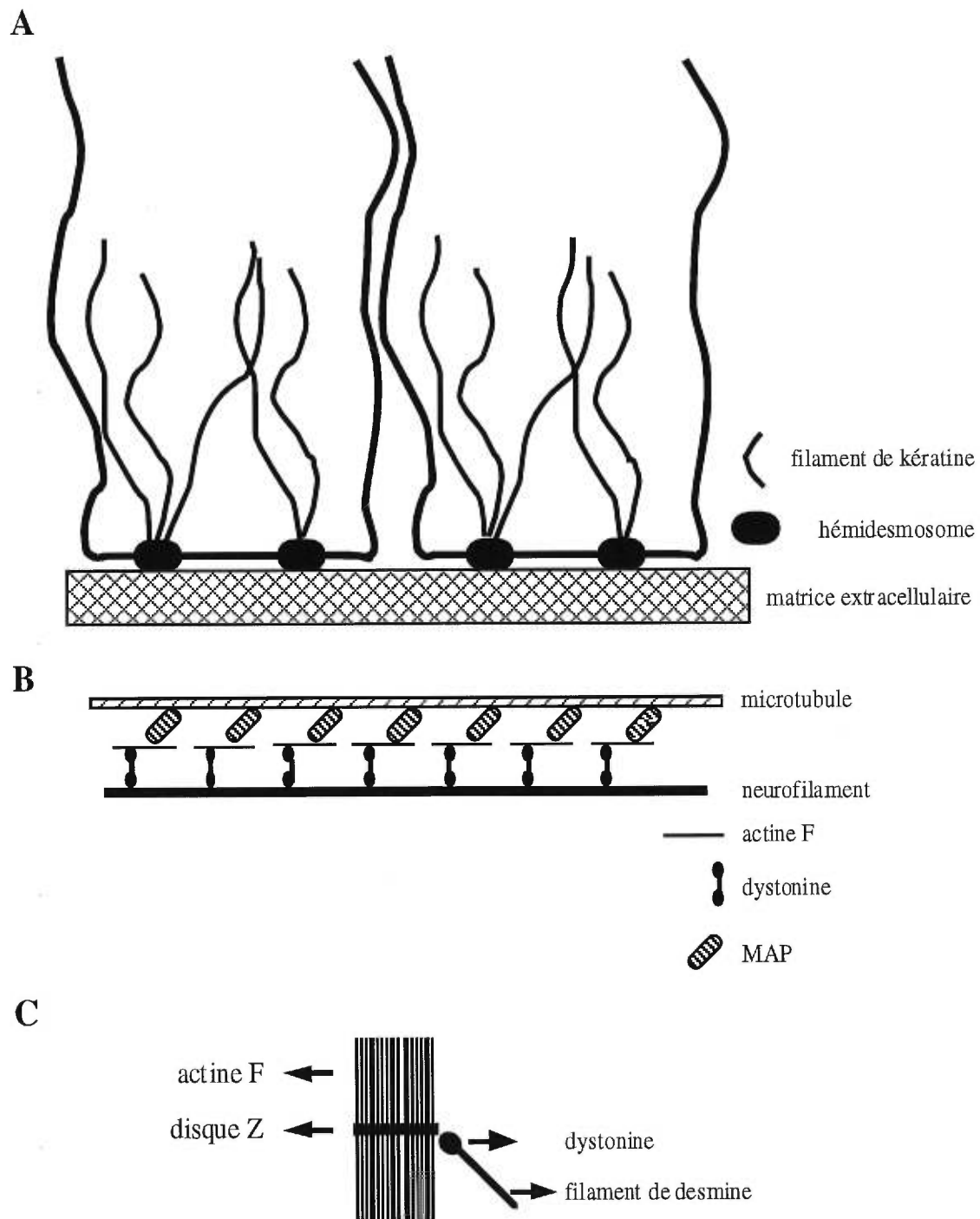
**Figure 2.** Rôle de la dystonine dans les fibres musculaires. Ce schéma représente la fonction de la dystonine dans les muscles squelettiques, qui serait d'ancrer les filaments de desmine aux disques Z et au sarcolemme. La dystonine servirait également à ancrer les filaments de desmine associés aux mitochondries sur les disques Z. La plectine jouerait un rôle similaire à celui de la dystonine et pourrait compenser partiellement pour la perte de fonction de la dystonine dans les fibres musculaires des souris *dt*.

## La dystonine comme organisateur des filaments intermédiaires

La dystonine possède deux domaines fonctionnels lui permettant de s'associer simultanément à l'actine F et aux FIs et, de créer ainsi un pont entre ces deux types de filaments. Nous avons observé une désorganisation du cytosquelette dans les neurones et les fibres musculaires *dt*, et ces observations nous permettent de conclure que l'organisation des FIs y est nettement affectée par une perte de fonction de la dystonine. Ces données suggèrent qu'un lien entre l'actine F et les FIs est essentiel au maintien de l'organisation des FIs. D'autres études ont démontré l'existence de MFs courts à l'intérieur de l'axone, en association avec les autres éléments du cytosquelette (Fath and Lasek, 1988). Ces études, ainsi que nos données, suggèrent un rôle stabilisateur à l'actine F de l'axone. Les MFs courts de l'axone étant intégrés aux MTs par les MAPs, la dystonine servirait à ancrer les NFs dans ce réseau composé de l'actine F et des MTs (Figure 3). Dans les fibres musculaires, la desmine est associée à des structures cellulaires riches en actine F, soit les myofibrilles et le sarcolemme. La dystonine permettrait aux filaments de desmine d'être ancrés dans ces structures, et de cette façon, elle participerait au maintien de l'architecture musculaire. Un parallèle peut être fait entre les kératinocytes et les muscles striés quant au mécanisme mis en oeuvre pour organiser les FIs. L'isoforme Bpag1 est localisé sur la face interne des hémidesmosomes des kératinocytes, dans lesquelles il ancre les filaments de kératine (Figure 3) (Klatte and Jones, 1994). Des études effectuées sur une protéine homologue à Bpag1, la desmoplakine, ont démontré l'importance du domaine N-terminal de cette famille de protéines dans l'ancrage aux desmosomes et aux hémidesmosomes (Bornslaeger et al., 1996; Stappenbeck et al., 1993). La perte de Bpag1 entraîne la dissociation des filaments de kératine des hémidesmosomes (Guo et al., 1995). Dans les muscles squelettiques, les structures équivalentes aux hémidesmosomes seraient les disques Z et, dans le muscle cardiaque et lisse, ces structures seraient respectivement les disques intercalaires et les plaques cytoplasmiques (Figure 3). Toutefois, le mécanisme

d'ancrage par la dystonine dans les muscles striés différerait de celui utilisé par Bpag1 dans la peau, par l'ajout d'un ABD permettant l'association aux disques Z riches en actine F.





**Figure 3.** Schéma représentant les différents mécanismes utilisés par Bpag1 et par la dystonine afin d'ancrer les filaments intermédiaires. A) Dans les kératinocytes, Bpag1 ancrerait les filaments de kératine sur la face interne des hémidesmosomes. B) Dans l'axone des neurones, la dystonine associerait les neurofilaments à l'actine F. L'actine F de l'axone formerait un complexe avec les protéines MAPs et les microtubules. C) Dans les muscles squelettiques, la dystonine ancrerait les filaments de desmine dans les disques Z.

## La dystonine comme stabilisateur des filaments d'actine

Nous avons immortalisé des cellules de Schwann *dtTg4* et de type sauvage à l'aide de l'antigène grand T du virus SV40 (annexe 3). Ces cellules expriment des marqueurs de cellules de Schwann telle que la protéine P0 et l'ARNm de *Pmp22* (annexe 3). L'ARNm de *Dst* est exprimé dans les cellules de Schwann de type sauvage mais pas dans les cellules *dtTg4* (annexe 3). Les cellules de Schwann *dtTg4*, contrairement à des cellules de Schwann de type sauvage, possèdent des prolongements multiples et irréguliers en culture cellulaire (annexe 3). Ce phénotype des cellules de Schwann *dtTg4* est moins sévère que celui des cellules de Schwann *dt<sup>27J</sup>*. Ces dernières ne peuvent, pour la majorité des cellules, adopter la morphologie bipolaire typique des cellules de Schwann en culture cellulaire (Bernier et al., 1998). L'actine F corticale est fragmentée dans les prolongements des cellules *dtTg4* (annexe 3), suggérant que ce phénomène serait responsable de la morphologie cellulaire irrégulière de ces cellules. À l'aide du système d'expression baculoviral, nous avons surexprimé l'ABD de la dystonine (baculovirus HIS-ABD) dans les cellules d'insecte Sf9. Lors d'une infection par un baculovirus, l'actine F des cellules Sf9 est progressivement dégradée par des protéases virales (Lanier et al., 1996). Les cellules Sf9 infectées avec le baculovirus HIS-ABD contiennent un réseau d'actine F intact (annexe 3), suggérant que l'ABD de la dystonine peut agir de façon modulaire en protégeant le réseau d'actine F. Il est donc possible qu'une des fonctions cellulaires de la dystonine soit de maintenir l'intégrité du réseau d'actine F. L'absence de la dystonine dans les cellules de Schwann *dtTg4* causerait la fragmentation de l'actine F au cortex cellulaire. Dans les muscles et les myotubes *dt*, un défaut d'assemblage des myofibrilles et des disques Z existe. Ces structures riches en actine F, seraient instables dans les myotubes *dt*, à cause d'une perte de fonction de l'ABD.

Dans les neurones, la dystonine pourrait également stabiliser l'actine F de l'axone. La neurodégénérescence peut être retardée jusqu'au 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> mois après la naissance chez l'allèle *dt<sup>Alb</sup>*, contrairement aux allèles *dt<sup>Tg4</sup>*, *dt<sup>24J</sup>* et *dt<sup>27J</sup>*, chez qui le phénotype apparaît entre 7 et 15 jours *post partum* (Messer and Gordon, 1979; Messer and Strominger, 1980). Ce phénomène pourrait être expliqué par une influence du background génétique de ces souris. Chez les souris *dt<sup>Alb</sup>*, la perte de l'ADN génomique codant pour le gène *Bpag1* laisse intacte la portion 5' des transcrits de *Dst* codant pour l'ABD (Brown et al., 1995a). En conséquence, l'allèle *dt<sup>Alb</sup>* n'est pas un allèle nul et les neurones sensitifs des souris *dt<sup>Alb</sup>* expriment un transcrit codant pour une dystonine tronquée contenant l'ABD. Au niveau génétique, il existe donc une corrélation entre l'expression de l'ABD et une protection de quelques mois face au processus dégénératif.

La présence de dégénérescence dans des axones exempts de NFs chez les souris *dt/dt,NFH-lacZ*, suggère que la désorganisation des NFs n'est pas le seul facteur pouvant initier la maladie (Eyer et al., 1998). La dystonine étant un lien entre les NFs et l'actine F, on pourrait concevoir que le maintien de l'organisation de l'actine F soit un facteur déterminant pour empêcher la dégénérescence. Dans ce contexte, la dystonine se servirait des NFs pour organiser les MFs. On ne peut exclure la possibilité selon laquelle la stabilisation biochimique des filaments d'actine pourrait empêcher la neurodégénérescence. Cette stabilisation pourrait, comme dans l'expérience du baculovirus, être une forme de maintien contre le désassemblage de l'actine F. Une instabilité de l'actine F chez les souris *dt* affecterait le reste du cytosquelette de l'axone, y compris les MTs qui sont normalement associés aux MFs. Ce modèle est compatible les observations d'Eyer car, l'absence de la dystonine chez les souris *dt* et l'absence des NFs dans les axones des souris *dt/dt,NFH-lacZ* sont deux phénomènes équivalents au niveau du phénotype de ces souris. Afin de vérifier la validité de ce modèle, il serait intéressant de mesurer *in vitro* si l'ABD de la dystonine protège l'actine F contre une dépolymérisation par la cytochalasine b. Un peu

comme dans l'expérience du baculovirus HIS-ABD, on pourrait générer une souris transgénique exprimant ce domaine dans le système nerveux. Ces souris transgéniques pourraient alors être croisées avec les souris *dt* afin de déterminer si une amélioration du phénotype peut être apportée aux neurones *dt*.

### **La dystonine participerait à l'organisation spatiale de l'actine F et des filaments intermédiaires**

La dystonine, non seulement contribuerait à maintenir l'intégrité de l'actine F ou des FIs, mais pourrait également contribuer à l'organisation spatiale du cytosquelette. Les expériences de transfection de la protéine GFP-linker dans les cellules COS-1 ont démontré que cette mini-dystonine peut déplacer l'actine F des fibres de tension vers le réseau de FIs. Cette observation indique qu'un pont entre l'actine F et les FIs peut réorganiser le cytosquelette. La co-transfection de la dystonine et des NFs dans des cellules exemptes de FIs a permis à Yang (Yang et al., 1996) d'observer un alignement entre le réseau d'actine F et les NFs. Il est cependant difficile à partir de cette expérience d'affirmer que la dystonine a provoqué le déplacement de l'actine F vers les NFs ou qu'il y ait eu un déplacement des NFs vers l'actine F car, ces cellules n'expriment normalement pas les NFs. Il serait intéressant de surexprimer la dystonine dans des neurones, des myotubes, des cellules de Schwann ou d'autres types de cellules afin de déterminer si la dystonine peut induire une réorganisation du cytosquelette. Est-ce le réseau d'actine F ou le réseau de FIs qui sera réorganisé?

### **La dystonine comme intégrateur du cytosquelette**

Il est possible que ces expériences réfutent le modèle suggérant que la dystonine induise une réorganisation de l'actine F ou des FIs. La seule fonction de la dystonine pourrait être de stabiliser le cytosquelette en intégrant le réseau d'actine F et de FIs. Cette

stabilisation par la dystonine pourrait prendre plusieurs formes, soit la stabilisation du réseau de MFs par l'ancrage de l'actine F aux FIs ou soit la stabilisation des FIs par l'ancrage des FIs à l'actine F. Ces deux modèles sont compatibles avec le type de désorganisation du cytosquelette ayant été observée dans les neurones, les muscles et les cellules de Schwann *dt.* Ce rôle d'intégrateur des différents éléments du cytosquelette pourrait également contribuer à la "tensigrité" des cellules. L'existence de liens interfilaments tel que la dystonine permettrait aux différents types de filaments du cytosquelette d'agir en synergie comme un seul élément protégeant la morphologie et l'intégrité de la cellule. Les cellules contenant la dystonine posséderaient un niveau d'organisation supplémentaire sur le plan de la tension et du maintien de l'intégrité du cytosquelette. Ce niveau supplémentaire de tensigrité pourrait être essentiel dans des cellules possédant une morphologie très particulière comme les neurones, les fibres musculaires et les cellules de Schwann. Suivant ce modèle, la perte de la dystonine dans ces cellules spécialisées s'ensuivrait d'anormalités au niveau du maintien de l'intégrité de l'architecture cellulaire.

## **Annexe 1. La dystonine est une protéine conservée au cours de l'évolution**

### **Le clonage d'un homologue de la dystonine chez le poulet**

En utilisant une sonde d'ADN-c de la portion N-terminale de la dystonine de souris, nous avons criblé une bibliothèque d'ADN-c provenant du cerveau d'embryons de poulet (13 jours de développement embryonnaire). Plusieurs clones contenant des ADN-c homologues ont été identifiés et séquencés. Les séquences obtenues de ces différents clones ont été utilisées pour générer une séquence représentant l'ARNm de la dystonine de poulet (figure 1). Jusqu'à présent, nous avons cloner 2.3 kb d'ADN-c. Les transcrits de *Dst* ont une taille de 15 kb dans le système nerveux de la souris (Brown et al., 1995a), suggérant qu'une grande portion de la séquence reste à être clonée sous forme d'ADN-c. Des analyses de séquences révèlent toutefois que la portion clonée jusqu'à présent représente un homologue véritable de la dystonine chez le poulet. La séquence nucléotidique de la dystonine de poulet possède une homologie de 82% (sur 1532 nucléotides) avec l'isoforme I de *Dst* de la souris et de 87% (sur 1385 nucléotides) avec l'isoforme I de *Dst* chez l'humain. Cette homologie est encore plus élevée au niveau de la séquence polypeptidique, soit de 90% (sur 510 acides aminés) et de 92% (sur 461 acides aminés) avec l'isoforme I de la dystonine chez la souris et l'humain respectivement.

**La dystonine de poulet possède une structure homologue à celle de la souris et de l'humain.**

Tout comme pour la dystonine chez l'humain et la souris, le dystonine de poulet possède la signature d'un domaine de liaison à l'actine (ABD). Un domaine homologue est présent chez plusieurs protéines liant l'actine telle que la dystrophine, l'actinine  $\alpha$  et la

spectrine  $\beta$  (Figure 2A). Un arbre évolutif révèle que le domaine ABD de la dystonine de poulet est davantage lié à celui de la dystonine de la souris et de l'humain qu'à celui de la spectrine  $\beta$ , de l'actinine  $\alpha$  ou à celui de la dystrophine.

Des alignements de séquences effectués avec le domaine en amont du domaine ABD de la dystonine de poulet révèle que cette portion de la séquence est également très conservée avec celle de l'isoforme I de la dystonine de souris et de l'humain ainsi qu'avec l'isoforme I de mACF7 (figure 2C). Cette homologie indique que nous avons probablement identifié un homologue de l'isoforme I de la dystonine chez la souris et l'humain. Cette portion de la séquence chez la souris est codée par l'exon A (figure 1 de l'introduction), un exon qui est délété chez les souris *dtTg<sup>4</sup>*. Un arbre évolutif révèle que ce domaine est davantage conservé à l'intérieur de la famille de la dystonine qu'avec des protéines homologues comme mACF7. Toutefois, la très grande conservation de cette séquence au cours de l'évolution suggère que ce domaine situé en amont du domaine ABD jouerait possiblement un rôle dans la liaison de la dystonine à l'actine F.

Les séquences de la portion C-terminale de la dystonine du poulet possèdent une très grande homologie avec la protéine BPAG1 humaine. Un alignement de ces deux séquences polypeptidiques révèle une homologie de 87% (sur 349 acides aminés) (figure 2E). Ces données indiquent que l'ajout d'un domaine ABD en N-terminal de Bpag1 est un phénomène conservé chez le poulet.

**Figure 1.** La séquence nucléotidique partielle et le polypeptide prédit de l'isoforme 1 de *Dst* chez le poulet. La séquence doublement soulignée représente le domaine conservé avec l'isoforme I de la dystonine chez la souris et l'humain (voir la figure 2C de cette annexe). La séquence non-soulignée contient une très grande homologie avec celle codant pour l'ABD de plusieurs protéines liant l'actine (voir figure 2A de cette annexe). La séquence soulignée simplement possède une très grande homologie avec la protéine BPAG1 de l'humain (voir figure 2E de cette annexe).



10 30 50  
GGCCGCTTGCCTCGGGAGCCGAGCGGGCGTGGGCAGCGCTACGAGCCCCGGCCATGGCT  
 G R L P R E P S G A W A A L R A P A M A  
 70 90 110  
GGCTACCTCTCCCCGGCGCTACTTCTATAACCGAGGAGCAGGAGTACCTGCAAGCCTAC  
 G Y L S P G A Y F Y T E E Q E Y L Q A Y  
 130 150 170  
GAGGATGTGTTGGAGAGATACAAAGATGAACGGGATAAAGTACAAAAGAAGACCTTCA  
 E D V L E R Y K D E R D K V Q K K T F T  
 190 210 230  
 AAATGGATAAATCAACATCTCATGAAGGTTTCGAAAACATGTGAATGACCTCTATGAAGAC  
 K W I N Q H L M K V R K H V N D L Y E D  
 250 270 290  
 CTAAGAGATGGACATAACTTGATCTCACTTTTAGAAGTCCTTTCCGGAGACACCCTGCCC  
 L R D G H N L I S L L E V L S G D T L P  
 310 330 350  
 CGAGAAAAAGGTCGGATGCGTTTTTCACAGACTCCAGAACGTCCAAATTGCACTTGACTAT  
 R E K G R M R F H R L Q N V Q I A L D Y  
 370 390 410  
 TTGAAAAAGCGCCAGGTGAAACTGGTCAACATTAGGAATGATGACATAACAGATGGGAAT  
 L K K R Q V K L V N I R N D D I T D G N  
 430 450 470  
 CCCAAGTTGACTTTGGGGTTGATATGGACCATAATTTTGCACCTTTCAGATATCTGATATC  
 P K L T L G L I W T I I L H F Q I S D I  
 490 510 530  
 CATGTTACTGGAGAGTCAGAGGACATGTCTGCTAAAGAAAGATTGCTCCTGTGGTACAG  
 H V T G E S E D M S A K E R L L L W S Q  
 550 570 590  
 CAGACAACTGAGGGTTATGCTGGAATCCGTTGTGAAAATTTCACTACCTGCTGGCGTGAT  
 Q T T E G Y A G I R C E N F T T C W R D  
 610 630 650  
 GGAAGATTATTAAATGCCATCATTCGTAAATACAGGCCGGACCTGATAGACATGAATACC  
 G R L F N A I I R K Y R P D L I D M N T  
 670 690 710  
 GTTGCTGTTCAAAGCAACCTTGCAAATTTAGAACATGCTTTTTTTGTAGCAGAAAAACTT  
 V A V Q S N L A N L E H A F F V A E K L  
 730 750 770  
 GGTGTTGCCAGGCTTCTGGATCCTGAAGATGTTGATGTTTCTCACCTGATGAGAAATCA  
 G V A R L L D P E D V D V S S P D E K S  
 790 810 830  
 GTAATAACTTATGTGTCATCACTTTATGATGCATTTCCCAAAGTACCAGAAGGTGGTGAA  
 V I T Y V S S L Y D A F P K V P E G G E

850 870 890  
 GGCATCAGTGCAAATGATGTTGAAGTCAAATGGGTTGAATATCAGAATATGGTGAAGTAC  
 G I S A N D V E V K W V E Y Q N M V N Y  
 910 930 950  
 CTCATGCAGTGGATCAGGCACCATGTCACAATAATGTCTGACAGAACATTTCCCAACAAT  
 L M Q W I R H H V T I M S D R T F P N N  
 970 990 1010  
 CCTGTGGAGCTGAAGGCACTTTATAATCAATATTTACAGTTTAAAGAAACAGATATTCCA  
 P V E L K A L Y N Q Y L Q F K E T D I P  
 1030 1050 1070  
 CCTAAGGAGACAGATAAATTTAAAAATTTAAACGTCTATATAAACTGCTGGAGGTCTGGATA  
 P K E T D K L K I K R L Y K L L E V W I  
 1090 1110 1130  
 GAATTTGGACGCATCAAACCTTCTCAAGGCTATCATCCAAACGATATAGAAAAAGAATGG  
 E F G R I K L P Q G Y H P N D I E K E W  
 1150 1170 1190  
 GGAAAGCTTATTATTGCCATGCTGGAAAGAGAGAAGACTCTTAGGCCTGAAGTGGAGAGG  
 G K L I I A M L E R E K T L R P E V E R  
 1210 1230 1250  
TTGGAAATGCTGCAGCAGATTGCAAGCAGAATTCAGCGAGACAGCCGAAGCTGTGAGGAC  
 L E M L Q Q I A S R I Q R D S R S C E D  
 1270 1290 1310  
AAACTGATACTTGCCCGAATGCTCTGCAGGCTGACACCAAACGACTAGAGTCGGGGCTT  
 K L I L A R N A L Q A D T K R L E S G L  
 1330 1350 1370  
CAGTTTCAACACGAAGCAGAAATAGCTGGGTATCTTCTTGAATCTGAGAACCTTCTCCGC  
 Q F Q H E A E I A G Y L L E S E N L L R  
 1390 1410 1430  
CAGCAAGTGATTGATGCCCAAATTCCTTATTGATGGAAAAGTACTATCAGGCAGACCAGCTT  
 Q Q V I D A Q I L I D G K Y Y Q A D Q L  
 1450 1470 1490  
GTACAGAGGGTTGCAAAACTTCGTGATGAACTGATGGCCATACGAACCGAATGTTCTTCT  
 V Q R V A K L R D E L M A I R T E C S S  
 1510 1530 1550  
TTGTACAGCAAGGGACATGCACTGACAACAGAACAGACAAAAGCTGATGATATCAGGAATA  
 L Y S K G H A L T T E Q T K L M I S G I  
 1570 1590 1610  
ACTGAAAGCTTAAACTCAGGATTTACGACAAACCTAACTCCTGACTTAAATGCTGCAATG  
 T E S L N S G F T T N L T P D L N A A M  
 1630 1650 1670  
ACTCAAGGCTTAAACACCTAGTTTGACTTCTTCCAGTTTGACATCTGGCCTCTCATCAGGT  
 T Q G L T P S L T S S S L T S G L S S G

1690 1710 1730  
CTTACTTCCAGGCTGACACCAGCCATGACTCCTGCTTACACACCAGGCATCCCACCGCGG  
L T S R L T P A M T P A Y T P G I P P R  
1750 1770 1790

TTAATTCAAAGCTATGTAACAGGAGTAGATGGTGGAACCTCTGCAAACTCAAACCTTATG  
L I Q S Y V T G V D G G T L Q T L K L M  
1810 1830 1850

CAAATCAGAAAACCTCTTATGAAATCGGCTTTTGTGGACCAGAATTTAACAGAAGAAGAA  
Q I R K P L M K S A F V D Q N L T E E E  
1870 1890 1910

GTGAACATGAAATTTGTCCAGGACCTATTGAACTGGGTGGAAGAAATGCAGGTGCAACTT  
V N M K F V Q D L L N W V E E M Q V Q L  
1930 1950 1970

GATCGAGTGAATGGGGTTCAGATTTACCAAGTGTGAAAGCCATTTAGAAAATCACAAA  
D R V E W G S D L P S V E S H L E N H K  
1990 2010 2030

AATGTTACAGGGCTATTGAAGAATTTGAATCCAGCCTTAAAGAAGCAAAAATCAGTGAG  
N V H R A I E E F E S S L K E A K I S E  
2050 2070 2090

ATCCAAATGACTGCCCCCTCGAAACTCAGTTATGCGGAAAAATGCACAACTGGAAAGT  
I Q M T A P L K L S Y A E K L H K L E S  
2110 2130 2150

CAGTATTCAAACCTCTTGAACACATCAAGAAATCAGGAAAGGCATCTAGATACCCCTTCAC  
Q Y S K L L N T S R N Q E R H L D T L H  
2170 2190 2210

GATTTTGTCTCTCGTGCTACTAGAGAGCTGATATGGCTGAATGAAAAAGAAGAGGAGGAG  
D F V S R A T R E L I W L N E K E E E E  
2230

GTTGCATATGATTGGAGTAAAAGAAA  
V A Y D W S E R

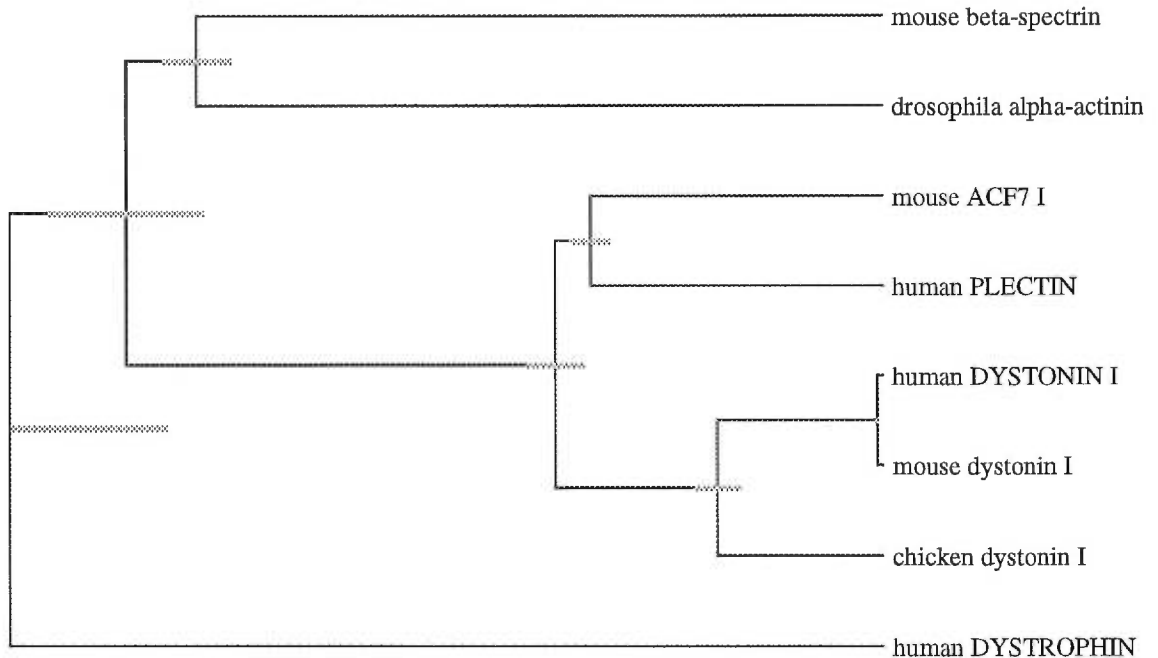
**Figure 2.** La séquence de la dystonine de poulet est très conservée au cours de l'évolution.

A) L'alignement de la séquence du polypeptide prédit du domaine de liaison à l'actine (ABD) de la dystonine de poulet avec l'ABD de la dystonine chez l'humain et la souris, la spectrine  $\beta$  de souris, l'actinine  $\alpha$  de la drosophile, la PLECTINE humaine et ACF7 de la souris. B) Un arbre évolutif de type UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) est illustré, et démontre le lien entre les différents ABDs provenant des séquences alignées en A. La longueur des lignes horizontales représente la distance génétique proportionnelle entre ces séquences. C) un alignement des séquences polypeptidiques en amont du domaine ABD de l'isoforme I de la dystonine chez la l'humain, la souris, le poulet et chez l'isoforme I d'ACF7 de la souris. D) Un arbre évolutif de type UPGMA démontre le lien phylogénique entre les séquences alignées en C. E) Un alignement entre la séquence polypeptidique de la dystonine du poulet (première ligne) et la portion N-terminale de la protéine BPAG1 chez l'humain (deuxième ligne). Les tirets entre ces deux séquences représentent une homologie parfaite, les deux points représentent un changement conservatif et le point seul représente un changement moins conservatif au niveau des acides aminés. Cet alignement a été créé à l'aide du programme BESTFIT (Altschul et al., 1990). Les alignements de A et C et les arbres évolutifs de B et D ont été créés avec le programme d'analyse GENWORK. Les cadres entourant certaines portions des alignements de A et de C représentent une homologie parfaite entre les séquences.

# A

human DYSTROPHIN	YEREDVQKKT	FTQWVNAQFS	KFGKQHIENL	FSDLQGERFL	LLLEDELTE	50
human DYSTONIN I	DERDRVQKKT	FTQWVNHLM	KVRK-HVNDL	YEDLRDGHNL	LSLLE/LSSE	49
mouse dystonin I	DERDRVQKKT	FTQWVNHLM	KVRK-HVNDL	YEDLRDGHNL	LSLLE/LSSE	49
chicken dystonin I	DERDRVQKKT	FTQWVNHLM	KVRK-HVNDL	YEDLRDGHNL	LSLLE/LSSE	49
mouse ACF7 I	DERDRVQKKT	FTQWVNHLM	KVRK-HINDL	YEDLRDGHNL	LSLLE/LSSE	49
human PLECTIN I	DERDRVQKKT	STQWVNHLL	KAQR-HISDL	YEDLRDGHNL	LSLLE/LSSE	49
mouse beta-spectrin	DEREAVQKKT	FTQWVNSHLA	RVSC-RITDL	YTDLRDGRML	IKLLE/LSSE	49
drosophila alpha-actinin	PAWEKQKKT	FTAWVNSHLR	KAGT-AIDNI	EEDFRNLEKL	MLLLE/ISSE	49
human DYSTROPHIN	RLEK-ENGST	RFEALNENK	ALRVLQNNW	GIWVIGSTII	MDGNPKLITG	99
human DYSTONIN I	TLER-ENGRM	RFRRLQNVQI	ALDYLRKRCV	RIVNIRNDII	TDGNPKLITG	98
mouse dystonin I	TLER-ENGRM	RFRRLQNVQI	ALDYLRKRCV	RIVNIRNDII	TDGNPKLITG	98
chicken dystonin I	TLER-ENGRM	RFRRLQNVQI	ALDYLRKRCV	RIVNIRNDII	TDGNPKLITG	98
mouse ACF7 I	MLER-ENGRM	RFRRLQNVQI	ALDFLKRCV	RIVNIRNDII	TDGNPKLITG	98
human PLECTIN I	SLER-ENGRM	RFRRLQNVQI	ALDYLRHRCV	RIVNIRNDII	TDGNPKLITG	98
mouse beta-spectrin	RLEKPTNCRM	RFECLNVDK	ALQPLKEQCV	RLENMGSHII	MDGNPKLITG	99
drosophila alpha-actinin	TLKPDRECM	RFRKINENK	ALDFIASKCV	RIVSIGAEII	MDGNPKLITG	99
human DYSTROPHIN	IIWIIILHFQ	VKNVMKNIMA	GLQPTNSEKI	LLHWVQSTR	NYPQVNVINF	149
human DYSTONIN I	IIWIIILHFQ	ISDIHVTGES	E--DMSAKER	LLHWVQQATE	GYAGIRCENF	146
mouse dystonin I	IIWIIILHFQ	ISDIHVTGES	E--DMSAKER	LLHWVQQATE	GYAGVRCENF	146
chicken dystonin I	IIWIIILHFQ	ISDIHVTGES	E--DMSAKER	LLHWVQQATE	GYAGIRCENF	146
mouse ACF7 I	IIWIIILHFQ	ISDIYISGES	G--DMSAKEK	LLHWVQKVTA	GYTGKCTNF	146
human PLECTIN I	IIWIIILHFQ	ISDIQVSGQS	E--DMTAKEK	LLHWVQRMVE	GYQGLRCENF	146
mouse beta-spectrin	IIWIIILRFQ	IQDISVETED	NKEKKSAKDA	LLHWVQMKTA	GYENVNINNF	149
drosophila alpha-actinin	IIWIIILRFA	IQDISVE---	---EMTAKEG	LLHWVQQRKA	RYKNVNVQNF	143
human DYSTROPHIN	TTSWFDGRL	NALIKYRFP	LFDWNSVVCQ	QSATORLEHA	FNIIRYQLGI	199
human DYSTONIN I	TTCWFDGRL	NALIKYRFP	LIDMNTVAVQ	-SNLANLEHA	FFVAEK-IGV	194
mouse dystonin I	TTCWFDGRL	NALIKYRFP	LIDMNTVAVQ	-SNLANLEHA	FFVAEK-IGV	194
chicken dystonin I	TTCWFDGRL	NALIKYRFP	LIDMNTVAVQ	-SNLANLEHA	FFVAEK-LGV	194
mouse ACF7 I	SSCWFDGKM	NALIKYRFP	LVMNERVQVQ	-SNRENLECA	FEVPER-LGV	194
human PLECTIN I	TSSWFDGRL	NALIKYRFP	LIDMNVYVQ	-TNLENLQCA	FEVARDLGV	195
mouse beta-spectrin	TTSWFDGMA	NALIKYRFP	LIDFDLKKKS	-NAHYNLQCA	FNLAQHLGL	198
drosophila alpha-actinin	HLSWFDGMA	CALLIKYRFP	LIDYAKLSKD	-NPLENLETA	FVVEKYLDI	192

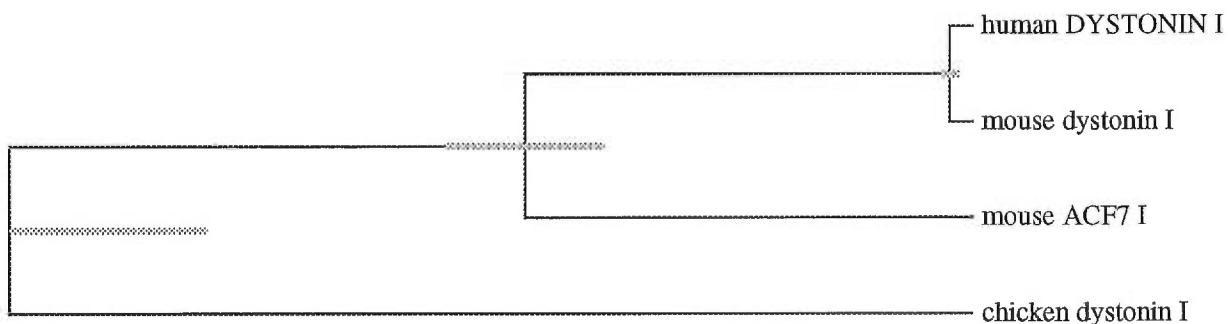
# B



C

mouse ACF7 I	-----	-----	-----	-----	EEEFVQAY EDVLERKDE	18
human DYSTONIN I	-----	-----	MA GYLSPAAYLY	VEE	EYVQLQAY EDVLERKDE	32
mouse DYSTONIN I	-----	-----	MA GYLSPAAYMY	VEE	EYVQLQAY EDVLERKDE	32
chicken DYSTONIN I	GRLPREPSGA	WAALRAPAMA	GYLSPGAYFY	TEE	EYVQLQAY EDVLERKDE	50

D



E

```

400 RLEMLQQIASRIQRDSRSCEDKLILARNALQADTKRLESGLQFQHEABIA 449
    |||||:|:|:| ||||| |||||:|:|:| |||||:|:|:| |||||
68 RLEMLQQIANRVQRDSVICEDKLILAGNALQSDSKRLESQVQFQNEABIA 117

450 GYLLESENLLRQQVIDAQILIDGKYYQADQLVQRVAKLRDELMAIRTECS 499
    |:| ||||| ||||| |||||:|:|:| |||||:|:|:| |||||
118 GYLLESENLLRQHVIVQILIDGKYYQADQLVQRVAKLRDEIMALRNECS 167

500 SLYSKGHALTTEQTKLMISGITESLNSGFTTNLTPDLNAAMTQGLTPSLT 549
    |:| ||||| |||||:|:|:| ||||| |||||:|:|:| |||||
168 SVYSKGRILTTEQTKLMISGITQSLNSGFAQTLHPSLTSGLTQSLTPSLT 217

550 SSSLTSGLSSGLTSRLTPAMTPAYTPGIIPRLIQSYVTGVDGGLQTLKL 599
    |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
218 SSSMTSGLSSGMTSRLTPSVTPAYTPGFPSPGLVPNFSSGVEPNLQTLKL 267

600 MQIRKPLMKSAFVDQNLTEEEVNMKFVQDLLNWVEEMQVQLDRVEWGS DL 649
    |||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
268 MQIRKPLKSSLLDQNLTEEEINMKFVQDLLNWVDEMQLDRFEWGS DL 317

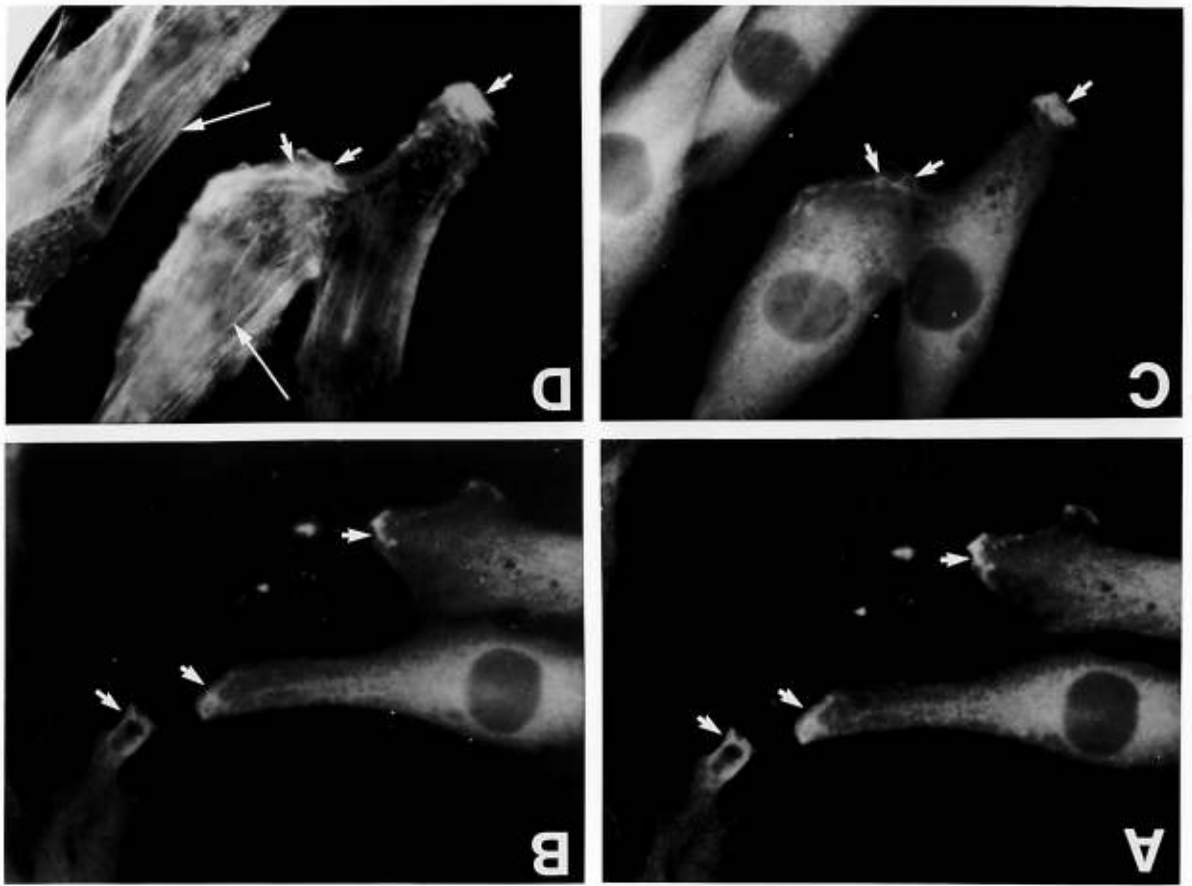
650 PSVESHLENHKNVHRAIEEFESSLKEAKISEIQMTAPLKL SYAEK LHKLE 699
    |||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
318 PSVESHLENHKNVHRAIEEFESSLKEAKISEIQMTAPLKL TYAEK LHRLE 367

700 SQYSKLLNTSRNQRHLDTLHDFVSRATRELIWLNEKEEEEVAYDWSER 748
    |||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
368 SQYAKLLNTSRNQRHLDTLHNFVSRATNELIWLNEKEEEEVAYDWSER 416
  
```

## **Annexe 2. La dystonine s'associe progressivement au cytosquelette**

La lignée cellulaire C2C12 est un modèle d'étude de la myogenèse. Ces cellules possèdent la capacité de fusionner spontanément en myotubes. La fusion des myoblastes ainsi que la maturation des myotubes sont accompagnées d'un réarrangement progressif du cytosquelette (Gard and Lazarides, 1980; Granger and Lazarides, 1979). Il existe une induction des niveaux de dystonine au début de la myogenèse, et cette induction coïncide avec celle de la desmine dans les myoblastes non-fusionnés. Nous avons voulu déterminer si la dystonine est progressivement associée au cytosquelette des myoblastes en différenciation à l'aide des cellules C2C12. Dans des cellules C2C12 individuelles induites à fusionner, nous avons déterminé la localisation de la dystonine et des FIs ainsi que celle de la dystonine et de l'actine F. La localisation de la dystonine dans les myoblastes coïncidait avec celle des FIs (figure 1A, B). Cependant, la dystonine et les FIs étaient accumulés de façon accentuée à la périphérie cellulaire (figure 1A, B). La dystonine n'était pas associée aux fibres de tension des myoblastes (figure 1C, D). Toutefois, une co-localisation partielle a été observée avec des MFs localisés à la périphérie cellulaire, dans des structures similaires à celles dans lesquelles la dystonine était co-localisée avec les FIs (figure 1C, D). Ces données suggèrent que la dystonine est une protéine généralement associée aux FIs des myoblastes, mais qu'il y aurait une association progressive entre la dystonine, les FIs et l'actine F au cours de la myogenèse.

Une association progressive de la dystonine au cytosquelette des neurones est également possible car, les niveaux de l'ARNm de *Dst* augmente au cours de la différenciation des cellules PC12 (figure 2). De plus, la dystonine est présente dans le corps cellulaire et les neurites de neurones différenciés en culture cellulaire (figure 2). Ces analyses suggèrent que la dystonine est progressivement incluse au cytosquelette des neurones.

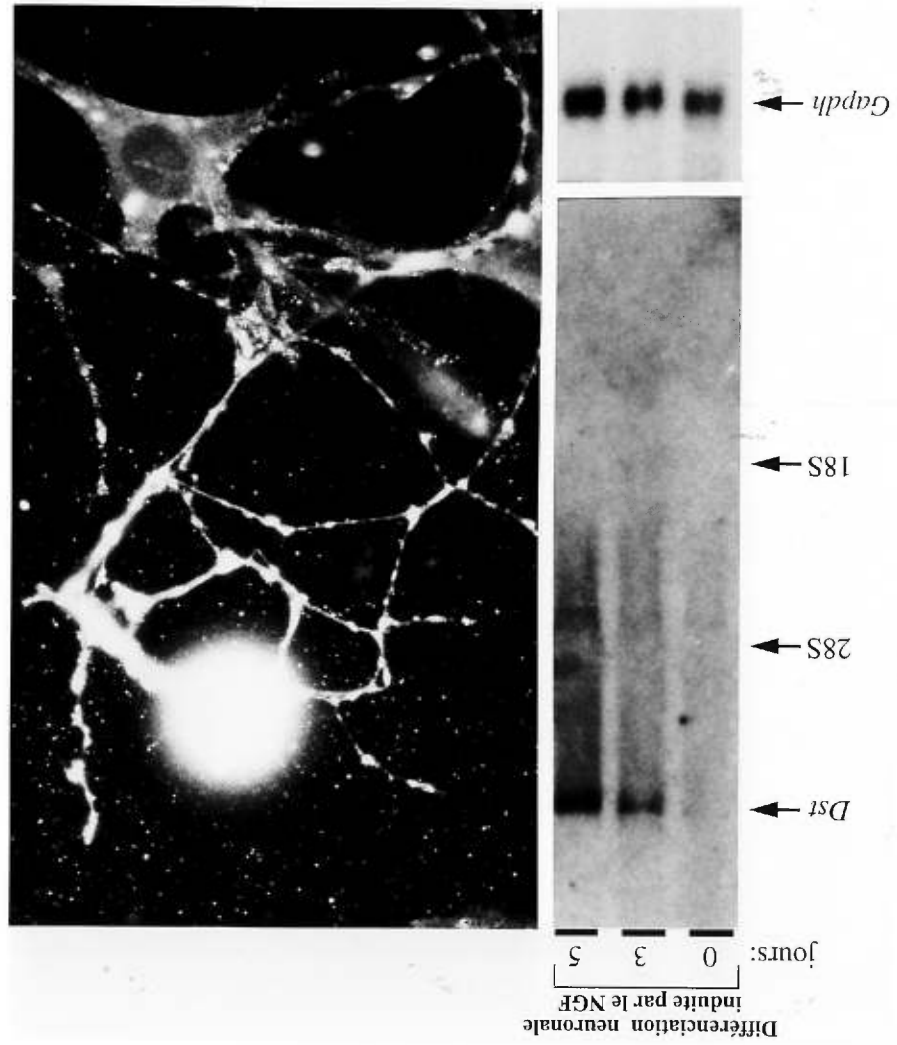


**Figure 1.** Association de la dystonine au cytosquelette des myoblastes. Les cellules C2C12

ont été cultivées en présence d'un milieu induisant la fusion en myotubes (DMEM contenant 10% de sérum de cheval). Des analyses d'immunofluorescence ont été effectuées sur ces cellules avec les anticorps gpAC1 (dystonine), N4142 (les FIS) et la phalloïdine-rhodamine (actine F). La dystonine (figure 1A) est co-localisée avec les FIS (figure 1B) dans le cytoplasme. Cette co-localisation avec les FIS était plus prononcée à la périphérie de la cellule (flèches sur la figure 1A et B). La dystonine (figure 1C) est également co-localisée avec l'actine F (figure 1D) à la périphérie de la cellule (courtes flèches sur la figure 1 C et D). Cependant, la dystonine localisée dans la partie plus interne du cytoplasme n'est pas co-localisée avec l'actine F des fibres de tension (longue flèches sur la figure 1D). Grossissement original, 400x.



**Figure 2.** Expression progressive de la dystonine dans les neurones. Des cellules PC12 ont été induites à différencier durant une période de 0, 3, et 5 jours à l'aide de 100 ng/ml de NGF (nerve growth factor). L'ARNm de ces cellules a été extrait, séparé par électrophorèse sur gel d'agarose et transféré sur une membrane de Nylon. Une sonde d'ADN-c radiomarquée de *Dst* a été hybridée sur la membrane. La bande correspondant au transcrit de 15 kb de *Dst* est indiquée par une flèche (panneau de gauche). La membrane a été ré-hybridée avec une sonde d'ADN-c de *Gapdh*, afin de vérifier la quantité d'ARNm présente sur la membrane. Les positions des bandes d'ARN ribosomique de 28S et de 18S sont indiquées. Une analyse par immunofluorescence effectuée à l'aide de l'anticorps gpAC1 sur une culture primaire de neurones de ganglions spinaux de souris a été effectuée. La dystonine est présente dans le corps cellulaire et dans le réseau de neurites de ces neurones, mais n'est pas présente dans les fibroblastes contenant ces cultures primaires (panneau de droite).



### Annexe 3. Déstabilisation de l'actine corticale des cellules de Schwann *dtTg4*

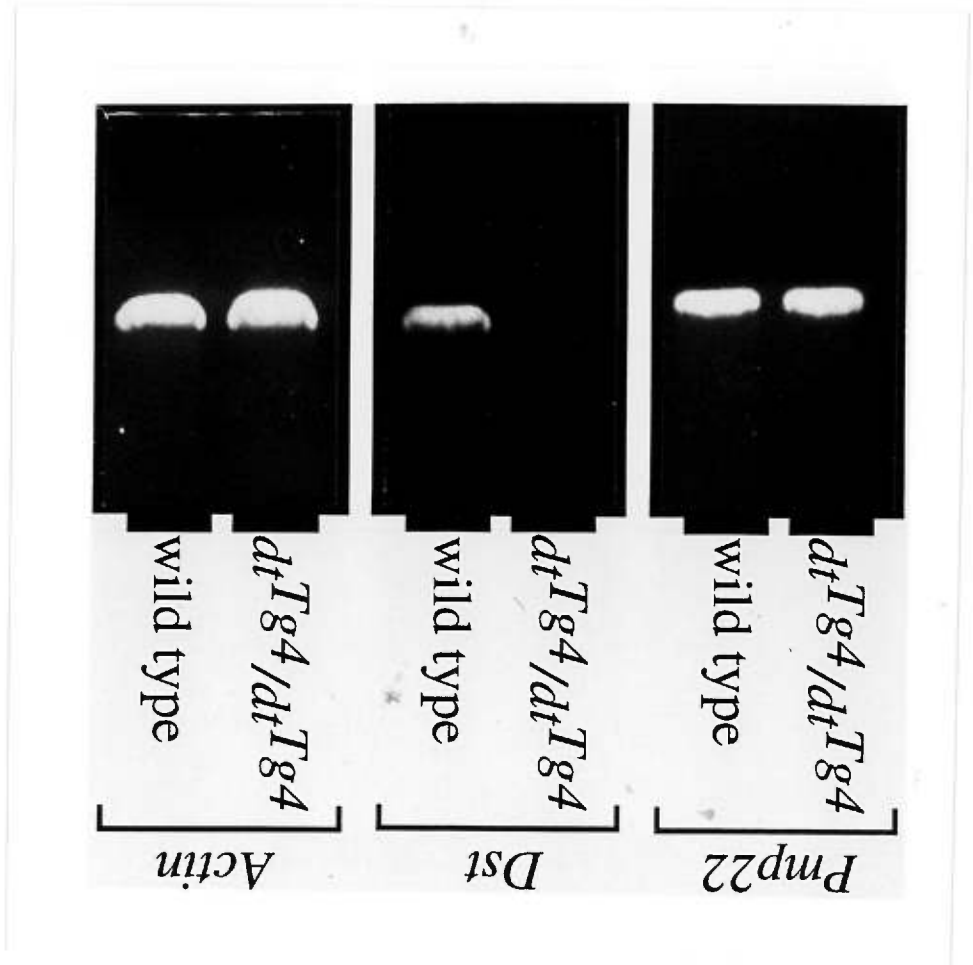
Des cellules de Schwann immortalisées *dtTg4/dtTg4* et de type sauvage ont été sélectionnées après la transfection de l'antigène grand T de SV40 (Pincon-Raymond et al., 1991; Schwartz et al., 1991). L'antigène grand T utilisée dans cette procédure d'immortalisation contient la mutation thermosensible *tsa58* qui produit une protéine fonctionnelle à la température permissive de 33°C et une protéine inactive à la température restrictive de 39°C (Pincon-Raymond et al., 1991). Après la transfection, plusieurs clones ont été sélectionnés à la température permissive de 33°C et ont continué à se diviser après de nombreux passages. Deux clones de chaque génotypes ont été caractérisés de façon plus extensive. Ces cellules adoptaient une morphologie de cellule de Schwann lorsque cultivées à 39°C dans un milieu induisant ce type de différenciation (Cheng and Mudge, 1996).

Les cellules *dtTg4/dtTg4* et de type sauvage exprimaient l'ARNm de *Pmp22* (figure 1) et la protéine P0 (figure 2A, 2B) après 24 heures de différenciation à 39°C. L'ARNm de *Dst* était exprimé dans les cellules de type sauvage, mais pas dans les cellules *dtTg4/dtTg4* (figure 1). Les cellules de type sauvage différenciées adoptaient une morphologie bipolaire typique de cellules de Schwann (Figure 2A). Ces cellules généraient deux prolongements contenant de l'actine F (Figure 2C). Les cellules de Schwann *dtTg4/dtTg4* généraient des prolongements multiples et irréguliers (Figure 2B). Les prolongements des cellules *dtTg4/dtTg4* contenaient également de l'actine F (figure 2D). L'actine F des prolongements des cellules de types sauvages était principalement organisée en faisceaux au cortex cellulaire (figure 2E). Une désorganisation de l'actine F au cortex cellulaire a été observée dans les prolongements des cellules *dtTg4/dtTg4*. Le réseau d'actine F cortical était fragmenté dans ces cellules (figure 2F).

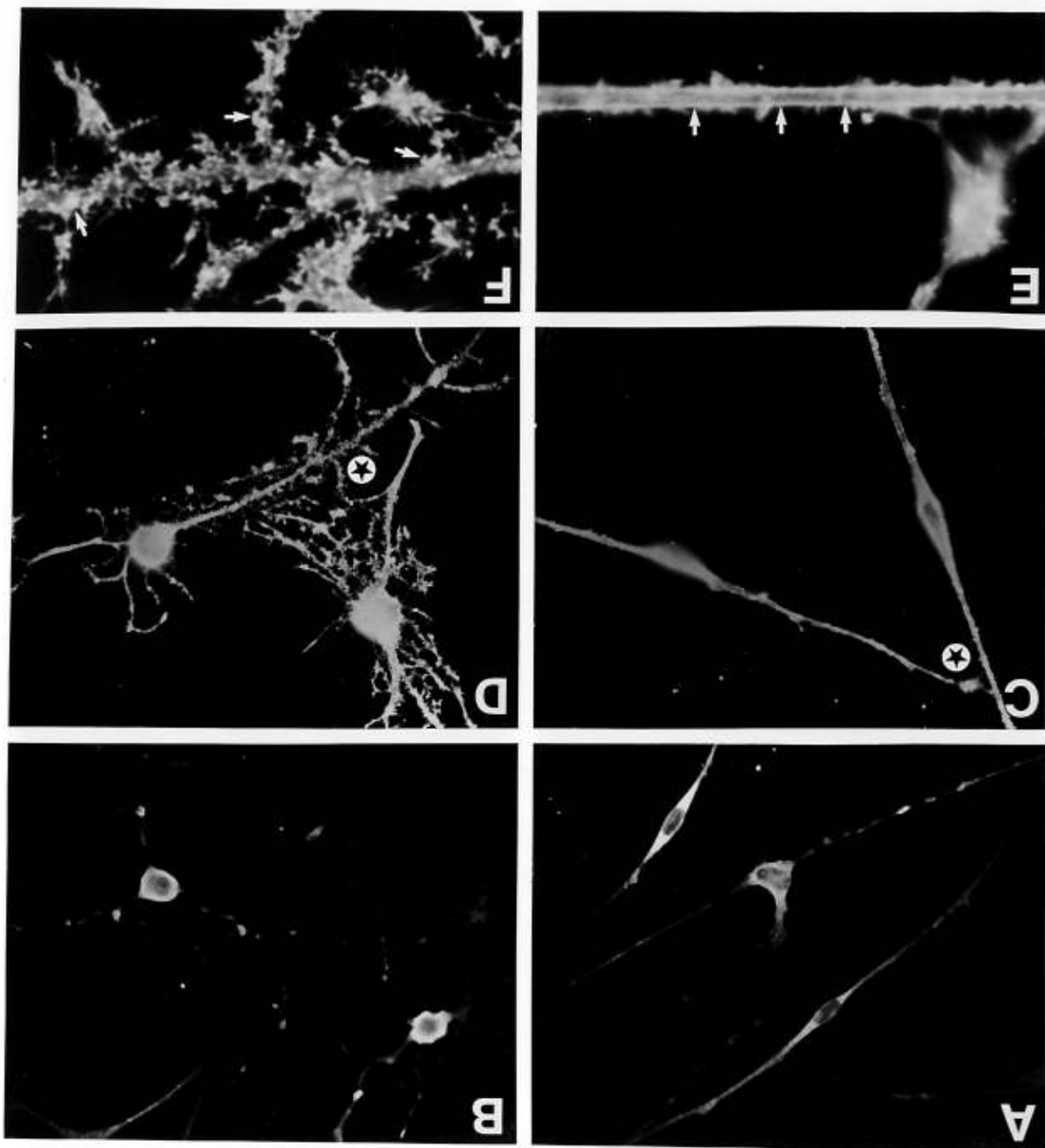
Le domaine de liaison à l'actine de la dystonine a été surexprimé sous la forme d'une protéine de fusion dans les cellules d'insecte Sf9 à l'aide du système baculoviral (Dalpé et al., 1998). Lors d'une infection normale par le baculovirus, les cellules Sf9 subissent un démantèlement progressif du réseau d'actine F (Lanier et al., 1996). Ce démantèlement serait causé par l'expression de protéases baculovirales s'attaquant aux filaments d'actine (Lanier et al., 1996). D'ailleurs, des cellules Sf9 infectées par le baculovirus contrôle HIS, codant pour un court domaine de poly-histidine de 25 acides aminés, ne contenaient plus d'actine F (figure 2B). Par contre, des cellules Sf9 infectées par le baculovirus HIS-ABD contenaient un réseau d'actine F intact (Figure 2 A, C, D). D'autre part, l'actine F des cellules infectées avec HIS-ABD était organisée en faisceaux (figure 2D).

Ces données indiquent que les cellules immortalisées qui ont été caractérisées dans cette étude peuvent adopter une morphologie de cellules de Schwann lorsqu'elles sont cultivées à 39°C. Ces cellules expriment également deux marqueurs de cellules de Schwann, soit la protéine P0 et l'ARNm de *Pmp22* (Cheng and Mudge, 1996; Kuhn et al., 1993; Lemke and Axel, 1985). Des cellules de génotypes *dtTg4/dtTg4* et de type sauvage ont été sélectionnées et, l'ARNm de *Dst* est exprimé dans les cellules de type sauvage. Par contre, les cellules *dtTg4/dtTg4* n'expriment pas l'ARNm de *Dst*. L'actine corticale des cellules *dtTg4/dtTg4* est fragmentée, ce qui pourrait être causé par une désorganisation ou une déstabilisation de l'actine F en l'absence de la dystonine. Nous avons aussi démontré que la surexpression de l'ABD de la dystonine dans des cellules Sf9 stabilise ou protège l'actine F de ces cellules face au démantèlement du réseau induit par le baculovirus. Ces données indiquent que la dystonine serait responsable du maintien de l'organisation de l'actine corticale des cellules de Schwann. Nos résultats suggèrent également que le domaine ABD pourrait agir de façon indépendante en tant que stabilisateur de l'actine F.

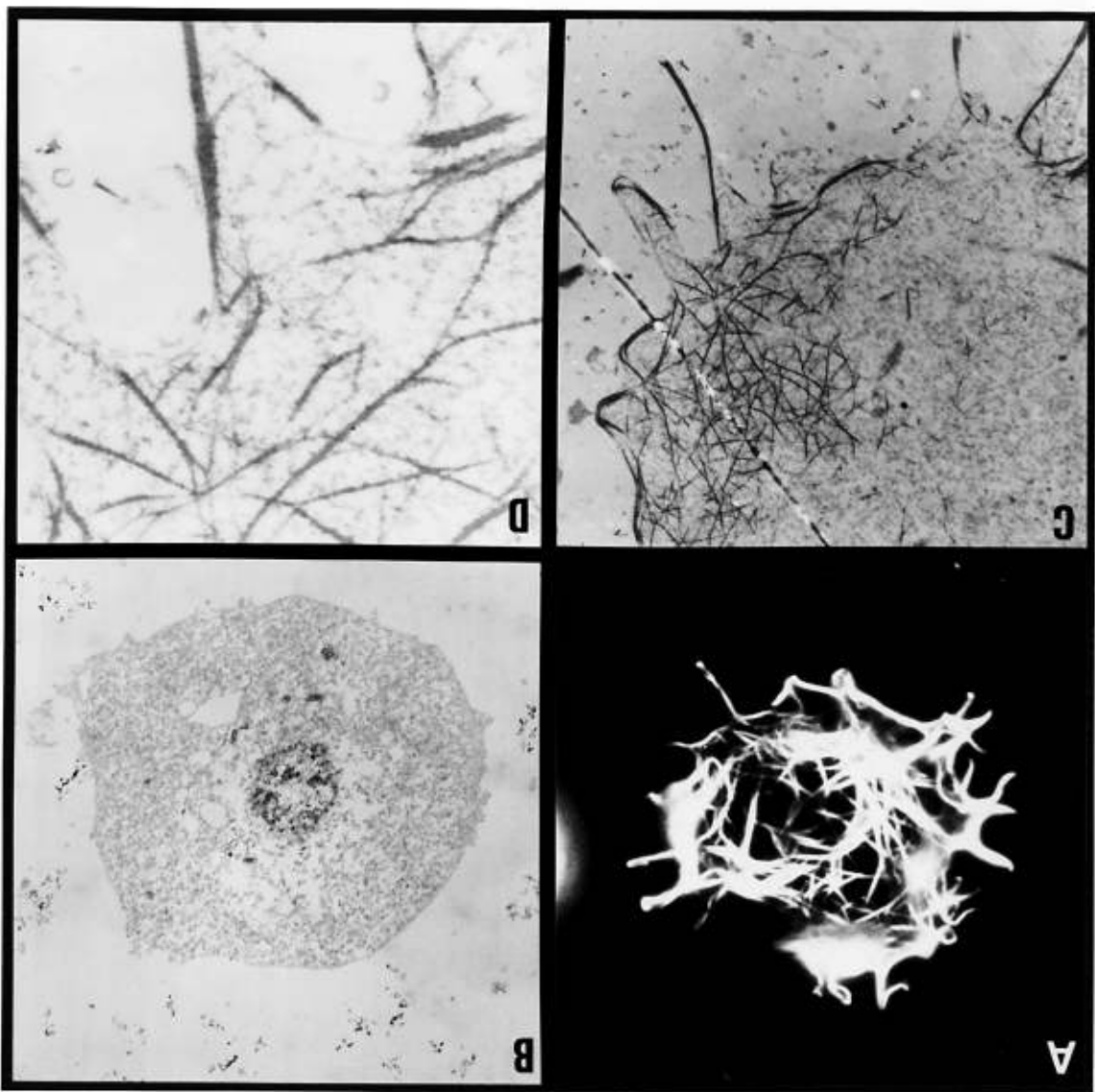
**Figure 1.** Immobilisation de cellules de Schwann *dtTg4*. Des cellules de Schwann de génotype *dtTg4/dtTg4* et de type sauvage ont été immortalisées à l'aide de l'antigène grand T de SV40 sous le contrôle du promoteur de l'actine  $\beta$ . Une mutation thermosensible de l'antigène grand T (*tsa58*) permet, à la température restrictive de 39°C, la différenciation des ces cellules immortalisées en cellules de Schwann. Des analyses par RT-PCR ont confirmé que les cellules *dtTg4/dtTg4* et de type sauvage (wild type) expriment l'ARNm de *Pmp22* (panneau de gauche). L'ARNm de *Dst* est exprimé dans les cellules de type sauvage mais pas dans les cellules *dtTg4/dtTg4* (panneau du centre). La qualité des préparations d'ADN-c a été vérifiée en amplifiant l'ADN-c de l'actine  $\beta$  (panneau de droite).



**Figure 2.** Un défaut de l'actine corticale existe dans les cellules de Schwann *dtTg4*. Les cellules de Schwann de type sauvage (A) et *dtTg4/dtTg4* (B) expriment la protéine P0. L'actine  $\gamma$  est présente dans les prolongements des cellules de types sauvages (C) et dans les prolongements multiples des cellules *dtTg4/dtTg4*. Noter la perte de la morphologie bipolaire des cellules de Schwann *dtTg4/dtTg4*. L'actine  $\gamma$  est principalement localisée au cortex cellulaire des prolongements des cellules de type sauvage (flèches de la figure 2E). Un démantèlement de l'actine  $\gamma$  est observé dans les prolongements des cellules *dtTg4/dtTg4* (figure 2F). Noter la disparition des faisceaux d'actine  $\gamma$  au cortex cellulaire (flèches de la figure 2F). Grossissement original, 400x.



**Figure 3.** La surexpression du domaine de liaison à l'actine (ABD) de la dystonine protège l'actine filamenteuse. Des cellules d'insectes Sf9 ont été infectées avec un baculovirus recombinant codant pour l'ABD de la dystonine (HIS-ABD en A, C, et D) ou un baculovirus contrôle (HIS en B). Toutes les cellules ont été infectées avec une multiplicité d'infection de 1:1 pendant 48 heures. Les cellules Sf9 infectées avec HIS-ABD contiennent un réseau d'actine F intact tel qu'observé en fluorescence à l'aide de la phalloïdine-rhodamine (A) ou à partir de préparations de cytosquelette observées en microscopie électronique (C, D). L'actine F est absente de préparations de cytosquelette de cellules Sf9 infectées avec HIS (B). Noter que l'actine F des cellules infectées avec HIS-ABD est organisée en faisceaux (D). Le grossissement original en A est de 400x. Pour B et C, 2 cm sur la photo est équivalent à 4  $\mu\text{m}$ , et en D, 2 cm est équivalent à 0.37  $\mu\text{m}$ .





## Références

- Ahn, A. H., and Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. [Review] [191 refs]. *Nature Genetics* 3, 283-91.
- Al-Ali, S. Y., and Al-Zuhair, A. G. H. (1989). Fine structural study of the spinal cord and spinal ganglia in mice afflicted with a hereditary sensory neuropathy, dystonia musculorum. *J. Submicroscopic Cytol. Pathol.* 21, 737-748.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amaratunga, A., Morin, P. J., Kosik, K. S., and Fine, R. E. (1993). Inhibition of kinesin synthesis and rapid anterograde axonal transport in vivo by an antisense oligonucleotide. *J. Biol Chem* 268, 17427-17430.
- Andrä, D., Lassmann, H., Bittner, R., Shorny, S., Fässler, R., Propst, F., and Wiche, G. (1997). Targeted inactivation of plectin reveals essential function in maintaining the integrity of skin, muscle, and heart cytoarchitecture. *Genes and Development* 11, 3143-3156.
- Ault, J. G., and Rieder, C. L. (1994). Centrosome and kinetochore movement during mitosis. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 41-49.
- Baas, P. W., Pienkowski, T. P., and Kosik, K. S. (1991). Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axonlike microtubules organization. *J. Cell Biol.* 115, 1333-1344.
- Bernier, G., Brown, A., Dalpe, G., De Repentigny, Y., Mathieu, M., and Kothary, R. (1995). Dystonin expression in the developing nervous system predominates in the neurons that degenerate in dystonia musculorum mutant mice. *Molecular & Cellular Neurosciences* 6, 509-20.

Bernier, G., Brown, A., Dalpe, G., Mathieu, M., De Repentigny, Y., and Kothary, R. (1995). Dystonin transcripts are altered and their levels are reduced in the mouse neurological mutant dt24J. *Biochemistry & Cell Biology* 73, 605-9.

Bernier, G., De Repentigny, Y., Mathieu, M., David, S., and Kothary, R. (1998). Dystonin is an essential component of the Schwann cell cytoskeleton at the time of myelination. *Development Submitted*.

Bernier, G., Mathieu, M., De Repentigny, Y., Vidal, S. M., and Kothary, R. (1996). Cloning and characterization of mouse ACF7, a novel member of the dystonin subfamily of actin binding proteins. *Genomics* 38, 19-29.

Binder, L. I., Frankfurter, A., and Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian nervous system. *J. Cell Biol.* 101, 1371-1378.

Bizzi, A., Crane, R. C., Autilio-Gambetti, L., and Gambetti, P. (1984). Aluminium effect on slow axonal transport: a novel impairment of neurofilament transport. *J. Neurosci.* 4, 722-731.

Bloom, G. S., and Vallee, R. B. (1983). Association of microtubule-associated protein 2 (map2) with microtubules and intermediate filaments in cultured brain cells. *J. Cell Biol.* 96, 1523-1531.

Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Stappenbeck, T. S., and Green, K. J. (1996). Breaking the connection: displacement of the desmosomal plaque protein desmoplakin from cell-cell interfaces disrupts anchorage of intermediate filament bundles and alters intercellular junction assembly. *Journal of Cell Biology* 134, 985-1001.

Borovikov, Y. S., Norman, J. C., Price, L. S., Weeds, A., and Koffer, A. (1995). Secretion from permeabilised mast cells is enhanced by addition of gelsolin: contrasting effects of endogenous gelsolin. *Journal of Cell Science* 108, 657-66.

Bretscher, A., and Weber, K. (1979). Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 2321-5.

Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J., and Kothary, R. (1995a). The mouse *dystonia musculorum* gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nature Genetics* **10**, 301-306.

Brown, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Rossant, J., and Kothary, R. (1994a). The genomic structure of an insertional mutation in the *Dystonia musculorum* locus. *Genomics* **20**, 371-376.

Brown, A., Dalpe, G., Mathieu, M., and Kothary, R. (1995b). Cloning and characterization of the neural isoforms of human dystonin. *Genomics* **29**, 777-80.

Brown, A., Lemieux, N., Rossant, J., and Kothary, R. (1994b). Human homolog of a mouse sequence from the *dystonia musculorum* locus is on chromosome 6p12. *Mamm. Genome* **5**, 434-437.

Bulinski, J. C., and Borisy, G. G. (1980). Microtubule-associated proteins from cultured HeLa cells. Analysis of molecular properties and effects on microtubule polymerization. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 11570-6.

Byers, R. K., and Banker, B. Q. (1961). Infantile spinal muscular atrophy. *Arch. Neurol.* **5**, 140-164.

Campbell, K. P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. [Review] [26 refs]. *Cell* **80**, 675-9.

Campbell, R. M., and Peterson, A. C. (1992). An intrinsic neuronal defect operates in *dystonia musculorum*: a study of *dt/dt*<>+/+ chimeras. *Neuron* **9**, 693-703.

Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F., and Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of Molecular Biology* **115**, 465-83.

Carpenter, S. (1968). Proximal axonal enlargement in motor neuron disease. *Neurol.* **18**, 841-851.

Chaponnier, C., and Gabbiani, G. (1989). Gelsolin modulation in epithelial and stromal cells of mammary carcinoma. *Am. J. Pathol.* *134*, 597-603.

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N. J., and Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* *360*, 674-677.

Chen, W. T., Hasegawa, E., Hasegawa, T., Weinstock, C., and Yamada, K. M. (1985). Development of cell surface linkage complexes in cultured fibroblasts. *Journal of Cell Biology* *100*, 1103-14.

Cheng, L., and Mudge, A. W. (1996). Cultured Schwann cells constitutively express the myelin protein P0. *Neuron* *16*, 309-319.

Chou, Y. H., Opal, P., Quinlan, R. A., and Goldman, R. D. (1996). The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. *Journal of Cell Science* *109*, 817-26.

Cole, N. B., and Lippincott-Schwartz, J. (1995). Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Current Opinion in Cell Biology* *7*, 55-64.

Collard, J. F., Coté, F., and Julien, J. P. (1995). Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* *375*, 61-64.

Correas, I., Padilla, R., and Avila, J. (1990). The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochemical Journal* *269*, 61-4.

Coté, F., Collard, J. F., and Julien, J.-P. (1993). Progressive neuropathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy chain: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell* *73*, 35-46.

Coulombe, P. A., Hutton, M. E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A. S., and Fuchs, E. (1991). Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses. *Cell* *66*, 1301-11.

Craig, S. W., and Powell, L. D. (1980). Regulation of actin polymerization by villin, a 95,000 dalton cytoskeletal component of intestinal brush borders. *Cell* 22, 739-46.

Dalpe, G., Leclerc, N., Vallé, A., Messer, A., Mathieu, M., deRepentigny, Y., and Kothary, R. (1998). Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Molecular & Cellular Neurosciences In Press*.

de Waegh, S. M., Lee, V. M., and Brady, S. T. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68, 451-63.

Delaunay, J. (1995). Genetic disorders of the red cell membranes. [Review] [40 refs]. *FEBS Letters* 369, 34-7.

Delisle, M. B., and Carpenter, S. (1984). Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 63, 241-250.

Dowling, J., Yang, Y., Wollmann, R., Reichardt, L. F., and Fuchs, E. (1997). Developmental expression of BPAG1-n: insights into the spastic ataxia and gross neurologic degeneration in dystonia musculorum mice. *Developmental Biology* 187, 131-42.

Duchen, L. W. (1976). Dystonia musculorum - an inherited disease of the nervous system in the mouse. *Adv. Neurol.* 14, 353-365.

Duchen, L. W., Falconer, D. S., and Strich, S. J. (1963). Dystonia Musculorum. A hereditary neuropathy of mice affecting mainly sensory pathways. *J. Physiol. (Lond.)* 165, 7-9.

Duchen, L. W., and Strich, S. J. (1964). Clinical and pathological studies of an hereditary neuropathy in mice. *Brain* 87, 367-378.

Eichner, R., Sun, T. T., and Aebi, U. (1986). The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments. *Journal of Cell Biology* 102, 1767-77.

- Elliott, C. E., Becker, B., Oehler, S., Castanon, M. J., Hauptmann, R., and Wiche, G. (1997). Plectin transcript diversity: identification and tissue distribution of variants with distinct first coding exons and rodless isoforms. *Genomics* 42, 115-25.
- Ellisman, M. H., and Porter, K. R. (1980). Microtrabecular structure of the axoplasmic matrix: visualization of cross-linking structures and their distribution. *Journal of Cell Biology* 87, 464-79.
- Errante, L. D., Wiche, G., and Shaw, G. (1994). Distribution of plectin, an intermediate filament-associated protein, in the adult rat central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* 37, 515-28.
- Ervasti, J. M., and Campbell, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *Journal of Cell Biology* 122, 809-23.
- Eyer, J., Cleveland, D. W., Wong, P. C., and Peterson, A. C. (1998). Pathogenesis of two axonopathies does not require axonal neurofilaments. *Nature* 391, 584-587.
- Eyer, J., and Peterson, A. (1994). Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12, 389-405.
- Faix, J., Steinmetz, M., Boves, H., Kammerer, R. A., Lottspeich, F., Mintert, U., Murphy, J., Stock, A., Aebi, U., and Gerisch, G. (1996). Cortexillins, major determinants of cell shape and size, are actin-bundling proteins with a parallel coiled-coil tail. *Cell* 86, 631-42.
- Fath, K. R., and Lasek, R. J. (1988). Two classes of actin microfilaments are associated with the inner cytoskeleton of axons. *Journal of Cell Biology* 107, 613-21.
- Ferreira, A., Niclas, J., Vale, R. D., Banker, G., and Kosik, K. S. (1992). Suppression of kinesin expression in cultured hippocampal neurons using antisense oligonucleotides. *J. Cell Biol.* 117, 595-606.

Fliegner, K. H., Ching, G. Y., and Liem, R. K. (1990). The predicted amino acid sequence of alpha-internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein. *EMBO Journal* 9, 749-55.

Fuchs, E., and Cleveland, D. W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519.

Gache, Y., Chavanas, S., Lacour, J. P., Wiche, G., Owaribe, K., Meneguzzi, G., and Ortonne, J. P. (1996). Defective expression of plectin/HD1 in epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation* 97, 2289-98.

Gard, D. L., Bell, P. B., and Lazarides, E. (1979). Coexistence of desmin and the fibroblastic intermediate filament subunit in muscle and nonmuscle cells: identification and comparative peptide analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 3894-8.

Gard, D. L., and Lazarides, E. (1980). The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell* 19, 263-75.

Gilbert, S. P., and Sloboda, R. D. (1989). A squid dynein isoform promotes axoplasmic vesicle translocation. *J. Cell Biol.* 109, 2379-2394.

Gluck, U., Kwiatkowski, D. J., and Ben-Ze'ev, A. (1993). Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with alpha-actinin cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 383-387.

Goldman, J. E., and Yen, S. H. (1986). Cytoskeletal protein abnormalities in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.* 19, 209-223.

Goldman, R. D., Khuon, S., Chou, Y. H., Opal, P., and Steinert, P. M. (1996). The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *Journal of Cell Biology* 134, 971-83.

Granger, B. L., and Lazarides, E. (1979). Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell* 18, 1053-63.

Green, K. J., Virata, M. L., Elgart, G. W., Stanley, J. R., and Parry, D. A. (1992). Comparative structural analysis of desmoplakin, bullous pemphigoid antigen and plectin: members of a new gene family involved in organization of intermediate filaments. *International Journal of Biological Macromolecules* *14*, 145-53.

Guo, L., Degenstein, L., Dowling, J., Yu, Q. C., Wollmann, R., Perman, B., and Fuchs, E. (1995). Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* *81*, 233-43.

Hanker, J. S., and Peach, R. (1976). Histochemical and ultrastructural studies of primary sensory neurons in mice with dystonia musculorum. I. Acetylcholinesterase and lysosomal hydrolases. *Neuropath. App. Neurobiol.* *2*, 79-97.

Hasegawa, T., Takahashi, S., Hayashi, H., and Hatano, S. (1980). Fragmin: a calcium ion sensitive regulatory factor on the formation of actin filaments. *Biochemistry* *19*, 2677-83.

Heidemann, S. R., Landers, J. M., and Hamborg, M. A. (1981). Polarity orientation of axonal microtubules. *J. Cell Biol.* *91*, 661-665.

Heins, S., and Aebi, U. (1994). Making heads and tails of intermediate filament assembly dynamics and networks. *Current Opinion in Cell Biology* *6*, 25-33.

Herrmann, H., Hofmann, I., and Franke, W. W. (1992). Identification of a nonapeptide motif in the vimentin head domain involved in intermediate filament assembly. *J. Mol. Biol.* *223*, 637-650.

Herrmann, H., and Wiche, G. (1987). Plectin and IFAP-300K are homologous proteins binding to microtubule-associated proteins 1 and 2 and to the 240-kilodalton subunit of spectrin. *J. Biol. Chem.* *262*, 1320-1325.

Heuser, J., and Kirschner, M. W. (1980). Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.* *86*, 212-234.

Hirano, A. (1991). Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases, L. P. Rowland, ed. (New York, N.Y.: Raven Press, Inc.).



- Hirano, A., Donnenfeld, H., Shoichi, S., and Nakano, I. (1984). Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *43*, 461-470.
- Hirokawa, N. (1982). Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etch method. *J. Cell Biol.* *94*, 129-142.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* *279*, 519-526.
- Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 74-81.
- Hirokawa, N., Bloom, G. S., and Vallee, R. B. (1985). Cytoskeletal architecture and immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins in regions of axons associated with rapid axonal transport: the beta,beta'-iminodipropionitrile-intoxicated axon as a model system. *Journal of Cell Biology* *101*, 227-39.
- Hirokawa, N., Glicksman, M. A., and Willard, M. B. (1984). Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* *98*, 1523-36.
- Hoffman, E. P., Brown, R. H., and Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* *51*, 919-928.
- Hofmann, I., and Herrmann, H. (1992). Interference in vimentin assembly in vitro by synthetic peptides derived from the vimentin head domain. *J. Cell Sci.* *101*, 687-700.
- Jameson, L., and Caplow, M. (1981). Modification of microtubule steady-state dynamics by phosphorylation of the microtubule-associated proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *78*, 3413-7.
- Janota, I. (1972). Ultrastructural studies of an hereditary sensory neuropathy in mice (dystonia musculorum). *Brain* *95*, 529-36.

Joshi, H. C. (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 55-62.

Julien, J. P., Meyer, D., Flavell, D., Hurst, J., and Grosveld, F. (1986). Cloning and developmental expression of the murine neurofilament gene family. *Brain Research* 387, 243-50.

Julien, J. P., and Mushynski, W. E. (1983). The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. *Journal of Biological Chemistry* 258, 4019-25.

Julien, J. P., and Mushynski, W. E. (1982). Multiple phosphorylation sites in mammalian neurofilament polypeptides. *Journal of Biological Chemistry* 257, 10467-70.

Kachinsky, A. M., Dominov, J. A., and Miller, J. B. (1994). Myogenesis and the intermediate filament protein, Nestin. *Developmental Biology* 165, 216-228.

Kaplan, M. P., Chin, S. S., Fliegner, K. H., and Liem, R. K. (1990). Alpha-internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain. *Journal of Neuroscience* 10, 2735-48.

Kirschner, M. W. (1980). Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo. *J. Cell Biol.* 86, 330-334.

Klatte, D. H., and Jones, J. C. (1994). Purification of the 230-kD bullous pemphigoid antigen (BP230) from bovine tongue mucosa: structural analyses and assessment of BP230 tissue distribution using a new monoclonal antibody. *Journal of Investigative Dermatology* 102, 39-44.

Kosik, Y., and Finch, E. A. (1987). MAP2 and tau segregate into axonal and dendritic domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J. Neurosci.* 7, 3142-3253.

Kotani, S., Nishida, E., Kumagai, H., and Sakai, H. (1985). Calmodulin inhibits interaction of actin with MAP2 and Tau, two major microtubule-associated proteins. *Journal of Biological Chemistry* 260, 10779-83.

Kothary, R., Clapoff, S., Brown, A., Campbell, R., Peterson, A., and Rossant, J. (1988). A transgene containing *lacZ* inserted into the dystonia locus is expressed in neural tube. *Nature* 335, 435-7.

Kuhn, G., Lie, A., Wilms, S., and Muller, H. W. (1993). Coexpression of PMP22 gene with MBP and P0 during de novo myelination and nerve repair. *Glia* 8, 256-64.

Lanier, L. M., Slack, J. M., and Volkman, L. E. (1996). Actin binding and proteolysis by the baculovirus AcMNPV: the role of virion-associated V-CATH. *Virology* 216, 380-8.

Lazarides, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283, 249-256.

Lee, G., and Rook, S. L. (1992). Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J. Cell Sci.* 102, 227-237.

Lee, M. K., and Cleveland, D. W. (1994). Neurofilament function and dysfunction: involvement in axonal growth and neuronal disease. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 34-40.

Lee, M. K., Marszalek, J. R., and Cleveland, D. W. (1994). A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 13, 975-988.

Lee, M. K., Xu, Z., Wong, P. C., and Cleveland, D. W. (1993). Neurofilaments are obligate heteropolymers in vivo. *J. Cell Biol.* 122, 1337-1350.

Lemke, G., and Axel, R. (1985). Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* 40, 501-508.

Li, Z., Colucci-Guyon, E., Pincon-Raymond, M., Mericskay, M., Pournin, S., Paulin, D., and Babinet, C. (1996). Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin. *Developmental Biology* 175, 362-6.

Lin, J. J.-C., and Feramisco, J. R. (1981). Disruption of the in vivo distribution of the intermediate filaments in fibroblasts through the microinjection of a specific monoclonal antibody. *Cell* 24, 185-193.

Lyser, K. (1968). An electron microscopic study of centrioles in differentiating neuroblasts. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 20, 2015-2022.

Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (1995). Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 72-81.

Markey, F., Lindberg, U., and Eriksson, L. (1978). Human platelets contain profilin, a potential regulator of actin polymerisability. *FEBS Letters* 88, 75-9.

McCormick, M. B., Kouklis, P., Syder, A., and Fuchs, E. (1993). The roles of the rod end and the tail in vimentin IF assembly and IF network formation. *J. Cell Biol.* 122, 395-407.

Mercer, J. A., Seperack, P. K., Strobel, M. C., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1991). Novel myosin heavy chain encoded by murine dilute coat colour locus [published erratum appears in *Nature* 1991 Aug 8;352(6335):547]. *Nature* 349, 709-13.

Messer, A., and Gordon, D. (1979). Changes in whole tissue biosynthesis of gamma-amino butyric acid (GABA) in basal ganglia of the dystonia (dtAlb) mouse. *Life Sciences* 25, 2217-21.

Messer, A., and Strominger, N. L. (1980). An allele of the mouse mutant dystonia musculorum exhibits lesions in red nucleus and striatum. *Neuroscience* 5, 543-549.

Micklem, D. R. (1995). mRNA localisation during development. *Developmental Biology* 172, 377-395.

Milner, D. J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., and Capetanaki, Y. (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *Journal of Cell Biology* 134, 1255-70.

Mimura, N., and Asano, A. (1979). Ca<sup>2+</sup>-sensitive gelation of actin filaments by a new protein factor. *Nature* 282, 44-8.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics in nerve growth. *Neuron* 1, 761-772.

Mizutani, M., Nunoya, T., Yamasaki, H., and Itakura, C. (1992). The hypotrophic axonopathy mutant in Japanese quail. *Journal of Heredity* 83, 234-5.

Moir, R. D., and Goldman, R. D. (1993). Lamin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 408-411.

Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Alberts, B., and Agard, D. A. (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378, 638-40.

Morris, R. L., and Hollenbeck, P. J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J. Cell Biol.* 131, 1315-1326.

Moss, T. H. (1981a). Schwann cell involvement in the neurological lesion of the dystonic mutant mouse. *J. Neurol. Sci.* 49, 207-222.

Moss, T. H. (1981b). Segmental demyelination in the peripheral nerves of mice affected by a hereditary neuropathy (dystonia musculorum). *Acta Neuropathol.* 53, 51-56.

Mueller, S., Klaus, K. V., and Stanley, J. R. (1989). A 230 kD basic protein is the major bullous pemphigoid antigen. *J. Invest. Dermatol.* 92, 33-38.

Mutasim, D. F., Takahashi, Y., Labib, R. S., Anhalt, G. J., Patel, H. P., and Diaz, L. A. (1985). A pool of bullous pemphigoid is intracellular and associated with the basal cell cytoskeleton-hemidesmosome complex. *J. Invest. Dermatol.* 84, 47-53.

- Pant, H. C., Shecket, G., Gainer, H., and Lasek, R. J. (1978). Neurofilament protein is phosphorylated in the squid giant axon. *Journal of Cell Biology* 78, R23-7.
- Pasternak, C., Wong, S., and Elson, E. L. (1995). Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *Journal of Cell Biology* 128, 355-61.
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., and Sweeney, H. L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3710-4.
- Peyron, E., Bour, H., Gaucherand, M., and Nicolas, J. F. (1995). Étude des sites épitopiques de l'antigène majeur de la pemphigoïde bulleuse (BPAg1). *Ann. Biol. Clin.* 53, 193-197.
- Pincon-Raymond, M., Vicart, P., Bois, P., Chassande, O., Romey, G., Varadi, G., Li, Z. L., Lazdunski, M., Rieger, F., and Paulin, D. (1991). Conditional immortalization of normal and dysgenic mouse muscle cells by the SV40 large T antigen under the vimentin promoter control. *Developmental Biology* 148, 517-28.
- Rodriguez Fernandez, J. L., Geiger, B., Salomon, D., and Ben-Ze'ev, A. (1992). Overexpression of vinculin suppresses cell motility in Balb/c 3T3 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 22, 127-134.
- Rosen, D. R. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 364, 362.
- Ruhrberg, C., Hajibagheri, M. A., Simon, M., Dooley, T. P., and Watt, F. M. (1996). Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin. *Journal of Cell Biology* 134, 715-29.
- Sadano, H., Inoue, M., and Taniguchi, S. (1992). Differential expression of vinculin between weakly and highly metastatic B16-melanoma cell lines. *Jpn J. Cancer Res.* 83, 625-630.

Sattilaro, R. F., Dentler, W. L., and LeCluyse, E. L. (1981). Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro. *Journal of Cell Biology* 90, 467-73.

Sawamura, D., Li, K.-H., Chu, M.-L., and Uitto, J. (1991). Human Bullous Pemphigoid Antigen (BPAG1): Amino acid sequences deduced from cloned cDNAs predict biologically important peptide segments and protein domains. *J. Biol. Chem.* 266, 17784-17790.

Sawamura, D., Nomura, K., Sugita, Y., Mattei, M. G., Chu, M. L., Knowlton, R., and Uitto, J. (1990). Bullous pemphigoid antigen: cDNA cloning and mapping of the gene to the short arm of human chromosome 6. *Genomics* 8, 722-726.

Schliwa, M. (1976). The role of divalent cations in the regulation of microtubule assembly. In vivo studies on microtubules of the heliozoan axopodium using the ionophore A23187. *Journal of Cell Biology* 70, 527-40.

Schnapp, B. J., and Reese, T. S. (1989). Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1548-1552.

Schultheiss, T., Zhongxiang, L., Ishikawa, H., Zamir, I., Stoeckert, C. J., and Holtzer, H. (1991). Desmin/Vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J. Cell Biol.* 114, 953-966.

Schwartz, B., Vicart, P., Delouis, C., and Paulin, D. (1991). Mammalian cell lines can be efficiently established in vitro upon expression of the SV40 large T antigen driven by a promoter sequence derived from the human vimentin gene. *Biology of the Cell* 73, 7-14.

Shecket, G., and Lasek, R. J. (1982). Neurofilament protein phosphorylation. Species generality and reaction characteristics. *Journal of Biological Chemistry* 257, 4788-95.

Shu, H. B., and Joshi, H. C. (1995). Gamma-tubulin can both nucleate microtubule assembly and self-assemble into novel tubular structures in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 130, 1137-47.

Skalli, O., Jones, J. C., Gagescu, R., and Goldman, R. D. (1994). IFAP 300 is common to desmosomes and hemidesmosomes and is a possible linker of intermediate filaments to these junctions. *Journal of Cell Biology* 125, 159-70.

Sloboda, R. D., Dentler, W. L., and Rosenbaum, J. L. (1976). Microtubule-associated proteins and the stimulation of tubulin assembly in vitro. *Biochemistry* 15, 4497-505.

Sotelo, C., and Guenet, J. L. (1988). Pathologic changes in the CNS of dystonia musculorum mutant mouse: an animal model for human spinocerebellar ataxia. *Neuroscience* 27, 403-424.

Stanley, J. R., Hawley-Nelson, P., Yuspa, S. H., Shevach, E. M., and Katz, S. I. (1981). Characterization of bullous pemphigoid antigen: a unique basement membrane protein of stratified squamous epithelia. *Cell* 24, 897-903.

Stanley, J. R., Tanaka, T., Mueller, S., Klaus-Kovtun, V., and Roop, D. (1988). Isolation of cDNA for bullous pemphigoid antigen by use of patients' autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 82, 1864-1870.

Stappenbeck, T. S., Bornslaeger, E. A., Corcoran, C. M., Luu, H. H., Virata, M. L., and Green, K. J. (1993). Functional analysis of desmoplakin domains: specification of the interaction with keratin versus vimentin intermediate filament networks. *Journal of Cell Biology* 123, 691-705.

Steinert, P. M., Idler, W. W., Cabral, F., Gottesman, M. M., and Goldman, R. D. (1981). In vitro assembly of homopolymer and copolymer filaments from intermediate filament subunits of muscle and fibroblastic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 3692-6.

Sugino, H., and Hatano, S. (1982). Effect of fragmin on actin polymerization: evidence for enhancement of nucleation and capping of the barbed end. *Cell Motility* 2, 457-70.

Svitkina, T. M., Verkhovsky, A. B., and Borisy, G. G. (1996). Plectin sidearms mediate interaction of intermediate filaments with microtubules and other components of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 135, 991-1007.



Takagishi, Y., Oda, S., Hayasaka, S., Dekker-Ohno, K., Shikata, T., Inouye, M., and Yamamura, H. (1996). The dilute-lethal (dl) gene attacks a Ca<sup>2+</sup> store in the dendritic spine of Purkinje cells in mice. *Neuroscience Letters* 215, 169-72.

Tanaka, Y., Kawahata, K., Nakata, T., and Hirokawa, N. (1992). Chronological expression of microtubule-associated proteins (MAPs) in EC cell P19 after neuronal induction by retinoic acid. *Brain Res.* 596, 269-278.

Tokuyasu, K. T., Dutton, A. H., and Singer, S. J. (1983a). Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle. *Journal of Cell Biology* 96, 1736-42.

Tokuyasu, K. T., Dutton, A. H., and Singer, S. J. (1983b). Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 96, 1727-35.

Trofatter, J. A., MacCollin, M. M., Rutter, J. L., Murrell, J. R., Duyao, M. P., Parry, D. M., Eldridge, R., Kley, N., Menon, A. G., and Pulaski, K. (1993). A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 72, 791-800.

Vandekerckhove, J., Bauw, G., Vancompernelle, K., Honore, B., and Celis, J. (1990). Comparative two-dimensional gel analysis and microsequencing identifies gelsolin as one of the most prominent downregulated markers of transformed human fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell Biol.* 111, 95-102.

Vassar, R., Coulombe, P. A., Degenstein, L., Albers, K., and Fuchs, E. (1991). Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64, 365-80.

Wang, K., and Singer, S. J. (1977). Interaction of filamin with f-actin in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 2021-5.

Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260, 1124-1127.

Weisenberg, R. C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* *177*, 1104-5.

Weisshaar, B., Doll, T., and matus, A. (1992). Reorganization of the microtubular cytoskeleton by embryonic microtubule-associated proteins 2 (MAP2c). *Development* *116*, 1151-1161.

Westgate, G. E., Weaver, A. C., and Couchman, J. R. (1985). Bullous pemphigoid antigen 1 localization suggests an intracellular association with hemidesmosomes. *J. Invest. Dermatol.* *84*, 218-224.

Wiche, G., Gromov, D., Donovan, A., Castanon, M. J., and Fuchs, E. (1993). Expression of plectin mutant cDNA in cultured cells indicates a role of COOH-terminal domain in intermediate filament association. *Journal of Cell Biology* *121*, 607-19.

Wilson-Pauwels, L., Akesson, E. J., and Stewart, P. A. (1988). *Cranial Nerves* (Toronto: B.C. Decker).

Wolfe, S. (1993). *Molecular and cellular biology* (Belmont, California: Wadsworth Publishing Company).

Wolosewick, J. J., and Porter, K. R. (1979). Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance. Artifact or reality. *Journal of Cell Biology* *82*, 114-39.

Wong, P. C., Marszalek, J., Crawford, T. O., Xu, Z., Hsieh, S. T., Griffin, J. W., and Cleveland, D. W. (1995). Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons. *J. Cell Biol.* *130*, 1413-1422.

Xu, Z., Cork, L. C., Griffin, J. W., and Cleveland, D. W. (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* *73*, 23-33.

Yamasaki, H., Bennett, G. S., Itakura, C., and Mizutani, M. (1992). Defective expression of neurofilament protein subunits in hereditary hypotrophic axonopathy of quail. *Laboratory Investigation* 66, 734-43.

Yamasaki, H., Itakura, C., and Mizutani, M. (1991). Hereditary hypotrophic axonopathy with neurofilament deficiency in a mutant strain of the Japanese quail. *Acta Neuropathologica* 82, 427-34.

Yang, Y., Dowling, J., Yu, Q. C., Kouklis, P., Cleveland, D. W., and Fuchs, E. (1996). An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell* 86, 655-65.

Yin, H. L., and Stossel, T. P. (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281, 583-6.

Yin, H. L., Zaner, K. S., and Stossel, T. P. (1980). Ca<sup>2+</sup> control of actin gelation. Interaction of gelsolin with actin filaments and regulation of actin gelation. *Journal of Biological Chemistry* 255, 9494-500.

Zhang, L., Marcu, M. G., Nau-Staudt, K., and Trifaro, J. M. (1996). Recombinant scinderin enhances exocytosis, an effect blocked by two scinderin-derived actin-binding peptides and PIP<sub>2</sub>. *Neuron* 17, 287-96.

Zhou, Y., and King, M. L. (1996). RNA transport to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology* 179, 173-183.