

Université de Montréal

Caractérisation fonctionnelle du gène AP1S1 mutant associé au syndrome de  
MEDNIK

par  
Stéphanie Côté

Programme de biologie moléculaire  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention d'une Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)  
en biologie moléculaire

Mars 2009

© Stéphanie Côté, 2009

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation fonctionnelle du gène AP1S1 mutant associé au syndrome de  
MEDNIK

présenté par :  
Stéphanie Côté

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gilbert Bernier  
Président-rapporteur

Patrick Cossette  
Directeur de recherche

Louis St-Amant  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Dans les cellules eucaryotes, le trafic intracellulaire de nombreuses protéines est assuré par des vésicules de transport tapissées de clathrine. Les complexes adaptateurs de clathrine (AP) sont responsables de l'assemblage de ces vésicules et de la sélection des protéines qui seront transportées. Nous avons étudié cinq familles atteintes du syndrome neurocutané MEDNIK qui est caractérisé par un retard mental, une entéropathie, une surdité, une neuropathie périphérique, de l'ichtyose et de la kératodermie. Tous les cas connus de cette maladie à transmission autosomique récessive sont originaires de la région de Kamouraska, dans la province de Québec. Par séquençage direct des gènes candidats, nous avons identifié une mutation impliquant le site accepteur de l'épissage de l'intron 2 du gène codant pour la sous-unité  $\sigma 1$  du complexe AP1 (*APISI*). Cette mutation fondatrice a été retrouvée chez tous les individus atteints du syndrome MEDNIK et altère l'épissage normal du gène, menant à un codon stop prématuré. Afin de valider l'effet pathogène de la mutation, nous avons bloqué la traduction de cette protéine chez le poisson zébré en injectant une séquence d'oligonucléotides antisenses spécifique à *APISI*.   48 heures après la fertilisation, les larves knock down pour *APISI* montrent une réduction de la pigmentation, une désorganisation de la structure de l'épiderme et une perturbation du développement moteur. Alors que la surexpression de l'*APISI* humain dans ce modèle a permis la récupération du phénotype normal, l'expression de l'*APISI* mutant fut sans effet sur les phénotypes moteurs et cutanés des larves knock down. Les résultats obtenus montrent que la mutation du *APISI* responsable du syndrome de MEDNIK est associée à une perte de fonction et que la sous-unité  $\sigma 1$  du complexe AP1 joue un rôle crucial dans l'organisation de l'épiderme et le développement de la moelle épinière.

Mots clés : Génétique, syndrome de MEDNIK, poisson zébré, adaptateur de clathrine

## ABSTRACT

Intracellular protein transport between organelles is mainly mediated by clathrin coated vesicles. Clathrin adaptor protein (AP) complexes participate in clathrin coated vesicle formation and in sorting protein cargo. We studied 5 families with MEDNIK syndrome, which is characterized by mental retardation, enteropathy, deafness, neuropathy, ichthyosis and keratoderma. All families affected with this autosomal recessive syndrome originate from an isolated population in the Kamouraska region of Quebec. The candidate genes identified in the positive region were sequenced and a founder mutation was identified in the acceptor splice site of intron 2 of the *AP1S1* gene. This gene encodes for the small subunit  $\sigma 1$  of the complex adaptor 1 (AP1). This splicing mutation leads to a premature stop codon, which is predicted to alter the normal function of this protein. To validate the pathogenic effect of this mutation we blocked the AP1S1 protein translation in zebrafish by injecting an anti-sense oligonucleotide designed against *AP1S1*. At 48 hours post fertilisation, the knockdown larvae showed reduced pigmentation, perturbation of skin formation, and severe perturbation of motor development and function motor development. Over expression of the human *AP1S1* rescued the normal phenotype whereas the expression of the mutant *AP1S1* did not. These results show that this mutation is causative for MEDNIK syndrome and demonstrates a critical role of the small subunit  $\sigma 1$  in epidermal organisation and in the development of the spinal cord.

Keywords: Genetic, MEDNIK syndrome, zebrafish, clathrin adaptor protein

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des sigles et des abréviations.....</b>	<b>xi</b>
<b>Dédicace.....</b>	<b>xix</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xv</b>

<b>Chapitre 1 Caractérisation fonctionnelle du gène AP1S1 mutant associé au syndrome de MEDNIK .....</b>	<b>1</b>
--	----------

<b>1. Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Historique et définition de la maladie .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Manifestations cliniques et histopathologiques .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Génétique et mécanismes moléculaires de l'érythrokeratodermie variabilis.....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Maladies similaires à l'érythrokeratodermie variabilis.....	5
1.3.1.1 L'érythrokeratodermie symétrique progressive .....	5
1.3.1.2 Le syndrome de Vohwinkel .....	5
1.3.1.3 Le syndrome de CEDNIK.....	6
<b>1.4 Variantes d'érythrokeratodermie variabilis et manifestations neurologiques associées.....</b>	<b>6</b>
1.4.1 Erythrokeratodermie variabilis avec ataxie.....	6
1.4.2 Forme atypique d'érythrokeratodermie variabilis de Kamouraska.....	6
<b>1.5 Étude génétique du syndrome MEDNIK.....</b>	<b>7</b>
1.5.1 Identification de la mutation dans le gène AP1S1 .....	7
<b>1.6 Biologie des adaptines .....</b>	<b>8</b>
1.6.1 La formation des vésicules tapissées de clathrines .....	8
1.6.2 Structure moléculaire des adaptines.....	9
<b>2. Projet de recherche.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Problématique .....</b>	<b>12</b>

<b>2.2 Hypothèse et objectifs</b> .....	13
<b>2.3 Pertinence et retombées</b> .....	14
<b>3. Matériel et méthodes</b> .....	14
<b>3.1 Caractérisation fonctionnelle de la mutation du gène AP1S1</b> .....	14
3.1.1 Le poisson zébré un modèle in vivo pour l'étude du gène AP1S1 .....	14
3.1.2 Inactivation du gène AP1S1 chez le poisson zébré.....	15
<b>3.2 Caractérisation du phénotype morphologique chez le morphant</b> .....	16
<b>3.3 Caractérisation du comportement et de la moelle épinière chez le morphant</b> .....	17
<b>4. Disruption of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord</b> .....	18
<b>4.1 Apport des coauteurs</b> .....	19
<b>4.2 Acknowledgments</b> .....	19
<b>4.3 Abstract</b> .....	19
<b>4.4 Introduction</b> .....	20
<b>4.5 Results</b> .....	22
4.5.1 Identification of mutated AP1S1 in individuals with MEDNIK.....	22
4.5.2 <i>Ap1s1</i> knockdown in zebrafish: morphological phenotype .....	23
4.5.3 Behavioural deficits and impaired spinal cord development in <i>Ap1s1</i> knockdown larvae .....	24
4.5.4 Overexpression of human mRNA rescues <i>Ap1s1</i> function in AMO larvae.....	25
<b>4.6 Discussion</b> .....	26
4.6.1 <i>In vivo</i> characterization of AP1S1 function .....	26
4.6.2 Behavioral deficits and abnormal neural development.....	28
4.6.3 The zebrafish <i>Ap1s1</i> knockdown and its contribution to understanding of the MEDNIK syndrome.....	29
<b>4.7 Material and methods</b> .....	30
4.7.1 Patients and Methods Patients and Biological materials.....	30
4.7.2 DNA amplification and mutation analysis.....	30
4.7.3 RT-PCR analyses .....	31
4.7.4 Cloning of human AP1S1 .....	31
4.7.5 Histology .....	32
4.7.6 Morpholino knockdown of <i>Ap1s1</i> in zebrafish .....	32
4.7.7 Western Blot .....	32
4.7.8 Immunohistochemistry.....	33
4.7.9 Imaging .....	34
<b>4.8 Figures and tables</b> .....	34

<b>Chapitre 2 Discussion et conclusion</b> .....	45
<b>1. Discussion</b> .....	45
<b>1.1 Développement du modèle animal pour l'étude du gène AP1S1</b> .....	45
1.1.1 Les mutants pour l'AP-2 .....	46
1.1.2 Des mutations dans l'AP-3 causent le syndrome d'Hermansky-Pudlak.....	46
1.1.3 Les mutants pour l'AP-1 .....	47
1.1.4 Rôle du complexe AP-1 dans le développement de l'épiderme, du transport et de la polarité cellulaire.....	48
<b>1.2 AP1-A versus AP1-B : différences et similarités</b> .....	49
<b>1.3 Pigmentation</b> .....	51
<b>1.4 Rôle de l'AP-1 dans le développement de l'épiderme, du transport et de la polarité cellulaire</b> .....	52
<b>2. Conclusion</b> .....	54
<b>3. Annexe</b> .....	55
<b>3.1 Description de ma contribution</b> .....	55
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	57

## LISTE DES TABLEAUX

### **Chapitre 1**

---

Tableau I : Les principaux complexes d'adaptines .....	10
Tableau supplémentaire I: Clinical features of affected individuals with MEDNIK.....	44



## LISTE DES FIGURES

### Chapitre 1

---

Figure 1 : Érythrokératodermie variabilis .....	2
Figure 2 : Gènes associés à des kératodermies et des kératodermies accompagnées de désordres neurologiques.....	4
Figure 3 : Vésicule tapissée de clathrine.....	9
Figure 4 : Représentation schématique hétérotétramérique des adaptines.....	10
Figure 5 : Représentation schématique du mécanisme d'action des adaptines.....	12
Figure 6 : Identification and characterization of a splice mutation in <i>APIS1</i> .....	38
Figure 7: Morphological phenotype of <i>Aplsl</i> knockdown zebrafish is rescued by over expression of human <i>APIS1</i> . .....	39
Figure 8: <i>Aplsl</i> knockdown is associated with abnormal distribution of laminin and cadherin. ....	40
Figure 9: Abnormal behavioral phenotype and impaired development of spinal neural network of <i>Aplsl</i> knockdown zebrafish. ....	41
Figure supplémentaire 1 : Typical erythrokeratoderma variabilis skin lesion.....	42
Figure supplémentaire 2: Representative transmitted light images of 48 hours-old zebrafish larvae illustrating the phenotype under different experimental conditions. ....	43

## **Chapitre 2**

---

Figure 10 : La phosphorylation de l'AP1..... 50

## LISTE DE SIGLES ET D'ABRÉVIATIONS

°C: Celsius

A: Affected individual

AD : Autosomique dominant

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMOs: Antisense morpholino oligonucleotides

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

AP : Adaptor protein

AP-1 : Adaptor protein-1

AR : Autosomique récessif

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

bp: base pair

BSA: bovine serum albumin

C : Cytosine

C: carrier

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CEDNIK: cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis and palmoplantar keratoderma

CH: compact hyperkeratosis

*CLDN15*: Claudin 15

cm : Centimètre

cM : Centimorgan

Ctrl: Control

Cx°:Connexine

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DNA: deoxyribonucleic acid

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid

EKV: Erythrokeratoderma Variabilis

EKV3: Erythrokeratoderma Variabilis type 3

GJ : Gap junction (Jonction communicante )

h : Heure

HCl: Hydroxychloride

HG: Hypergranulosis

HpF: Hours post-fertilization

HPS: Hermansky-Pudlak syndrome

HPS-2: Hermansky-Pudlak syndrome 2

Hz: Hertz

kb : Kilobase

KD: Knockdown

kDa : Kilo dalton

LDL : Low density lipoprotéine

LOR: Loricrine

M6PR : Mannose 6 phosphate-receptor

Mb: Mégabase

MDCK : Madin-Darby canine kidney

MEDNIK: Mental retardation, enteropathy, deafness, peripheral neuroathy, ichthyosis and keratodermia

Min: Minutes

ml: Millilitre

mm: Millimètre

mM: Millimolaire

MMO: mismatch morpholino oligonucleotides

mo: month

mRNA: messenger ribonucleic acid

N: normal

NA: not available

NaCl: Chlorure de sodium

ng: Nanogramme

nM : Nanomolaire

nm: Nanomètre

NMDA: N-methyl-D-aspartic acid

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PFA: paraformaldehyde

PH3: phosphorylated-histone-H3

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

PSEK : Progressive symmetrical erythrokeratoderma

PtdIns4P : phosphatidylinositol4-Phosphate

RNA: ribonucleic acid

RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulphate

sec: seconde

SNAP29 : soluble n-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein

SNP: single nucleotide polymorphisms

T : Thymine

TGN: trans-Golgi network

VLCFAs: Very Long Chain Fatty Acids (acides gras à longues chaînes)

WT: wild type

$\Delta$ Ct : difference in the threshold cycle

$\mu$ g: microgramme

$\mu$ m: Micromètre

## DÉDICACE

*À mon fils Zoé*

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Patrick Cossette de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir fait confiance. Je n'étais pas une « bencheuse » hors pair loin de là, mais enthousiaste à la découverte et curieuse de nouvelles expériences et collaborations. Le positivisme du Dr Cossette y est en grande partie responsable.

Je remercie les assistantes et techniciens de recherche des laboratoires où j'ai complété ma formation, Line Lapointe, Caroline Meloche et Josée Poirier, Guy Laliberté pour leurs enseignements des babas de la recherche en génétique.

Je remercie Alexandre Montpetit de m'avoir intégrée dans ce projet passionnant.

Je remercie tout spécialement le Dre Edna Brustein pour sa générosité professionnelle et surtout pour tout le plaisir que j'ai eu à travailler avec elle.

Je remercie Lysanne Patry et Amélie Piton pour leur agréable présence.

Je remercie tous les patients ayant participé à cette étude.

Je remercie le Fonds de la recherche en santé du Québec et le programme de biologie moléculaire de l'université de Montréal de m'avoir soutenue financièrement.

Je remercie mes amis et ma famille pour leurs encouragements et leur soutien.

Je remercie Luc, mon conjoint et Zoé mon fils de m'avoir facilité la tâche de la conciliation étude-famille.

# CHAPITRE 1 : Caractérisation fonctionnelle du gène AP1S1 mutant associé au syndrome de MEDNIK

---

## 1. Introduction

### 1.1. Historique et définition de la maladie

L'érythrokeratodermie variabilis (EKV; OMIM 133200) est une maladie génétique rare de la peau qui a été décrite pour la première fois en 1925 par Mendes da Costa, un dermatologue allemand <sup>1</sup>.

Le terme clinique «érythrokeratodermie» désigne un ensemble de maladies dermatologiques héréditaires caractérisées par la présence de lésions érythémateuses et de plaques d'hyperkératose <sup>2,3,4</sup>. Les érythrokeratodermies sont constituées de deux sous groupes majeurs: l'érythrokeratodermie variabilis (EKV, OMIM 133200) <sup>3,4,5</sup> et l'érythrokeratodermie symétrique et progressive (PSEK OMIM 602036) <sup>6,4</sup>. D'autres variantes de la maladie ont aussi été documentées, notamment l'érythrokeratodermie accompagnée d'ataxie<sup>7</sup> ainsi qu'une forme atypique d'érythrokeratodermie accompagnée de retard mental, entéropathie, surdité et neuropathie périphérique (MEDNIK) <sup>8</sup>.

### 1.2 Manifestations cliniques et histopathologiques

L'EKV est caractérisée par la présence de plaques érythémateuses et des plaques de kératose qui peuvent être localisées ou généralisées (Fig.1, page 2). Les lésions cutanées typiques de l'EKV sont habituellement présentes durant la première année de vie ou dès la naissance<sup>2</sup>. Les plaques d'érythème varient en taille, forme et localisation. La présence de ces plaques, qui peuvent être annulaires, circulaires et entourées d'un halo blanc, est accentuée par les températures extrêmes et le stress émotionnel. Une sensation de brûlure accompagne souvent l'apparition de ces lésions <sup>2</sup>.





**Figure 1 : Érythrokratodermie variabilis.** À gauche érythème. À droite hyperkératose symétrique sur les mains.

L'hyperkératose se caractérise par des plaques fixes d'érythème qui deviennent jaune brunâtre, dû à un excès de kératinisation de la peau. Ces plaques ont une distribution symétrique et une prédisposition à se développer dans les régions des genoux, des coudes, des aisselles, de l'abdomen ainsi que sur la paume des mains et la plante des pieds<sup>9</sup>. Bien que certaines parties du corps semblent être épargnées (e.g. visage, cuir chevelu), l'hyperkératose peut être généralisée. En comparaison avec les plaques érythémateuses, les lésions d'hyperkératose sont habituellement stables. De plus, il a été observé que des lésions érythémateuses pouvaient devenir stables et hyperkératotiques, tout comme des plaques d'hyperkératose pouvaient être associées à l'érythème<sup>10</sup>.

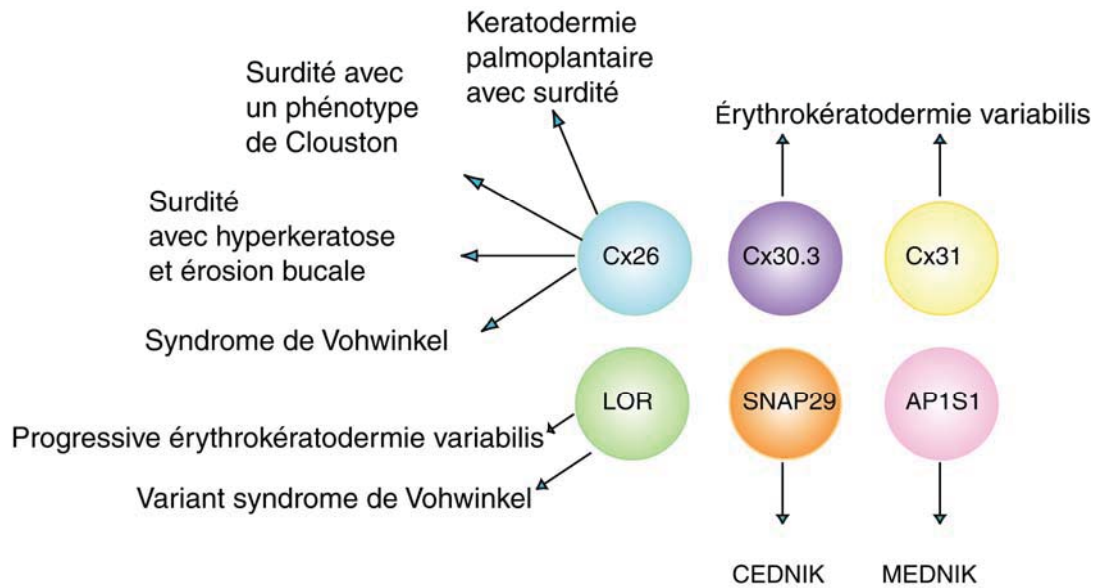
Chez environ 50 % des cas, l'hyperkératose peut aussi être associée avec une kératodermie palmo-plantaire<sup>5</sup>, qui est un épaississement exagéré de la peau. Ces manifestations peuvent apparaître de façon indépendante et peuvent coexister durant

des années. Dans les différentes formes d'EKV, il existe une grande variation phénotypique inter- et intra-familiale.

### 1.3 Génétique et mécanismes moléculaires de l'érythrokratodermie variabilis

Chez la majorité des familles, l'EKV présente un mode de transmission autosomique dominant avec pénétrance presque complète<sup>11,12,9,3</sup>. De rares familles avec transmission autosomique récessive ont également été décrites<sup>13,14</sup>. Le premier locus pour l'EKV a été localisé sur le chromosome 1p34-1p35.1<sup>11, 12</sup>. Dans cette région candidate de 40 kb, un total de 4 gènes codent pour des connexines (Cx30.3 (*GJB4*), Cx31 (*GJB3*), Cx31.1 (*GJB5*) et Cx37 (*GJA4*)).

Des mutations, principalement de type faux-sens, ont été identifiées dans des familles atteintes d'EKV, notamment dans le gène *GJB3* (Cx31)<sup>15,5,16,14,13</sup> et le gène *GJB4* (Cx30.3)<sup>9,3</sup>. Dans la connexine 31, huit mutations faux-sens ont été identifiées. La majorité d'entre elles sont responsables de l'EKV transmis selon un mode autosomique dominant<sup>15,5,16</sup>, alors que deux mutations dans le même gène causent l'EKV de type récessif<sup>14,13</sup>. Enfin, un total de cinq mutations faux-sens ont été répertoriées dans le gène codant pour la Cx30.3<sup>9,3</sup>, associé à l'EKV à transmission dominante.



**Figure 2.** Gènes associés à des kératodermies et des kératodermies accompagnées de désordres neurologiques. (Modifiée à partir de la figure 1 de l'article Lai-Cheong, J. et al (2007)<sup>17</sup>

### Abréviations

CEDNIK : Cerebral Dysgenesis Neuropathy Ichthyosis Palmoplantar Keratodermia

MEDNIK : Mental retardation, enteropathy, deafness, peripheral neuropathy, ichthyosis and keratodermia

Les connexines sont une famille de polypeptides qui constituent les différentes sous-unités des connexons, qui sont les principales composantes des jonctions communicantes (ou de type gap). Les connexines possèdent 4 domaines transmembranaires et deux domaines extracellulaires. Les jonctions communicantes permettent le passage d'ions, de seconds messagers ainsi que des petites molécules ayant une masse moléculaire inférieure à 1 kDa, à partir du cytoplasme d'une cellule au milieu intracellulaire de la cellule voisine<sup>18,19</sup>. L'inhibition du transport des protéines vers la membrane plasmique ainsi que de la formation des connexons pourraient être responsables de la perturbation du développement et du maintien de l'intégrité de l'épiderme en présence de mutations dans des gènes<sup>20</sup>. Il a été aussi suggéré que des mutations dans ces gènes peuvent entraîner la production d'hémicanaux actifs. Ces derniers laisseraient échapper des métabolites et des

molécules de signalisation dans le milieu extracellulaire, ce qui affecterait le comportement des cellules environnantes et pourrait initier la mort cellulaire.<sup>20</sup>

### **1.3.1 Maladies similaires à l'érythrokatodermie variabilis**

#### **1.3.1.1 L'érythrokatodermie symétrique progressive (PSEK)**

D'autres syndromes partagent des similarités cliniques avec l'EKV, notamment l'érythrokatodermie symétrique progressive (PSEK) (OMIM 602036)<sup>21</sup>. La différence majeure entre l'EKV et le PSEK est l'absence de lésions érythémateuses et une plus grande propension à la présence de kératose palmoplantaire. Une mutation localisée dans le gène codant pour la loritrine<sup>22</sup> (Fig. 2, page 4) a été identifiée chez des individus atteints de PSEK. Cette mutation consiste en une insertion (709insC) qui entraîne un décalage du cadre de lecture<sup>22</sup>.

La loritrine est une petite protéine distribuée dans la couche granuleuse de l'épiderme. C'est la protéine la plus abondante des enveloppes des cellules cornées qui remplacent la membrane plasmique des kératinocytes au cours de leur stade final de différenciation<sup>23</sup>. Cette protéine joue un rôle de protection contre l'environnement. Ce syndrome transmis selon un mode autosomique dominant et n'est pas associé à d'autres manifestations cliniques.

#### **1.3.1.2 Le syndrome de Vohwinkel**

Le syndrome de Vohwinkel (OMIM 124500) est caractérisé par une kératodermie palmoplantaire, de l'ichthyose et une surdité congénitale.

Une mutation faux-sens a été identifiée dans le premier domaine extracellulaire de la connexine GJB2 (Cx26)<sup>24</sup> chez des individus atteints de la maladie. De plus, une variante de ce syndrome est associée à une mutation identifiée dans le gène de la loritrine<sup>25</sup>. Cette insertion d'une paire de base se trouve à la position 730, soit 21 paires de base plus loin que la mutation retrouvée dans le syndrome PSEK.

### 1.3.1.3 Le syndrome de CEDNIK

Une mutation dans le gène *SNAP29* (soluble n-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein) a été récemment identifiée chez sept individus atteints du syndrome neurocutané CEDNIK <sup>26</sup>. Ces auteurs ont utilisé un acronyme afin de résumer les manifestations cliniques qui incluent kératodermie, ichthyosis, neuropathie périphérique, retard psychomoteur et dysplasie corticale (Cerebral Dysgenesis Neuropathy Ichthyosis Palmoplantar Keratoderma). Une délétion (220delG) impliquant le gène *SNAP29* a été retrouvé chez tous les individus atteints de ce syndrome rare, entraînant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. Cette protéine est impliquée dans la fusion de la membrane des vésicules de transport avec la membrane d'un compartiment cellulaire cible <sup>27</sup>.

## 1.4 Variantes d'EKV et manifestations neurologiques associées

### 1.4.1 Erythrokeratoderma variabilis avec ataxie

Giroux et Barbeau (1972) <sup>7</sup> ont décrit une famille canadienne française avec EKV associée à une ataxie cérébelleuse, sur cinq générations consécutives. Les individus atteints présentent des manifestations cutanées durant l'enfance, qui s'atténuent habituellement au début de l'âge adulte. Après l'âge de 40 ans, ces patients présentent des troubles progressifs de l'équilibre menant à une ataxie sévère. Richard et al. ont inclus cette famille pour leurs études de liaison et aurait conclu que cette famille serait liée au chromosome 1p34-35, soit le même locus que les autres variantes d'EKV <sup>15</sup>. La mutation responsable de ce syndrome n'a cependant pas été identifiée.

### 1.4.2. Forme atypique d'érythrokeratoderme variabilis de Kamouraska

Saba *et al* (2005) <sup>8</sup> ont décrit une variante atypique d'EKV caractérisée par des lésions cutanées compatibles avec EKV, une surdité congénitale, un retard psychomoteur, une neuropathie périphérique, des diarrhées sévères pouvant être fatales en bas âge, ainsi que qu'une élévation des acides gras à longues chaînes (VLCFAs) <sup>8</sup>. Des familles similaires avaient été préalablement décrites dans une

autre population <sup>28</sup>. Pour la variante canadienne-française, un mode de transmission autosomique récessif a été suspecté. De plus, en procédant à des analyses de généalogie ascendante, Saba *et al.* <sup>8</sup> ont déterminé que ces 5 familles originaires de la région de Kamouraska partageaient un nombre limité d'ancêtres communs, suggérant un effet fondateur. En procédant à une cartographie fine du génome et en recherchant les régions d'homozygoté, Saba *et al.* ont identifié le locus responsable sur le chromosome 7 <sup>8</sup>. Au départ, le syndrome a été nommé variante atypique d'EKV ou EKV3. Cependant, étant donné les manifestations très similaires à celles du syndrome CEDNIK <sup>26</sup> décrit subséquemment, ce syndrome unique à la population canadienne-française a été également renommé selon un nouvel acronyme soit MEDNIK (mental retardation, enteropathy, deafness, peripheral neuroathy, ichthyosis and keratodermia) (voir page 21).

En résumé, l'EKV est une maladie rare de la peau caractérisé par des plaques d'hyperkératose et des lésions d'érythème. Les mutations identifiées dans des gènes codant pour des connexines responsables de cette maladie se transmettent principalement selon un mode autosomique dominant. Cependant, plusieurs variantes d'EKV demeurent inexplicées et sont accompagnées d'une atteinte neurologique plus ou moins sévère, notamment le syndrome de MEDNIK nouvellement retrouvé dans la population québécoise. La recherche des mutations responsables de ces maladies contribuera à leur classification et à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires menant à la maladie.

## **1.5 Étude génétique du syndrome MEDNIK**

### **1.5.1 Identification de la mutation dans le gène AP1S1**

Basé sur les régions d'homozygoté, la cartographie fine des familles atteintes du syndrome de MEDNIK a permis de réduire la région candidate entre les marqueurs D7S2539 et D7S518, soit une région de 5,3 Mb. Bien qu'une famille supplémentaire se soit ajoutée à l'étude, cela n'a pas permis de réduire davantage la région candidate (données non illustrées). Dans cette région, deux gènes codant pour des connexines

sont retrouvés, mais le séquençage de ces gènes n'a pas permis d'identifier de mutations.

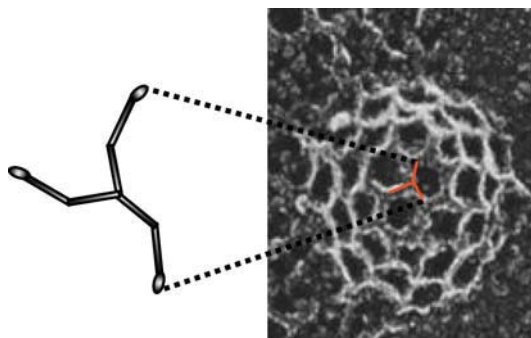
Tel que mentionné, un nouveau syndrome, appelé CEDNIK, a été décrit et associé à une mutation dans le gène *SNAP29*<sup>26</sup>. Ce syndrome qui partage des similarités phénotypiques avec MEDNIK est causé par une mutation dans le gène *SNAP29* qui code une protéine, SNARE, impliquée dans le transport cellulaire. Considérant cette information, la liste des gènes candidats situés sur le locus 7q22 a été révisée et deux gènes impliqués dans le transport cellulaire ont été identifiés, notamment une claudine et un autre codant pour la sous-unité sigma de la protéine adaptatrice de la clathrine (*AP1S1*). Aucune mutation n'a été retrouvée dans le gène codant pour la claudine. En revanche, le séquençage du gène *AP1S1* a permis d'identifier une mutation au site accepteur d'épissage de l'intron 2 (Fig. 6B et D, page 38). Cette mutation prédit l'excision de l'exon 3, générant un codon stop prématuré au début de l'exon 4.

## **1.6. Biologie des adaptines**

Le gène *AP1S1* code pour une petite sous-unité (157aa) située au cœur d'un complexe protéique tétramérique, l'adaptine 1 (AP-1)<sup>29,30,31</sup>. La structure moléculaire et les fonctions de ce complexe protéique sont présentées brièvement dans cette section.

### **1.6.1. La formation des vésicules tapissées de clathrines**

Les protéines de sécrétion sont transportées entre les organelles par des vésicules de transport. Les vésicules tapissées de clathrines jouent un rôle primordial dans le transport des protéines de la membrane plasmique ou de l'appareil de Golgi trans vers les endosomes, les lysosomes et la membrane basolatérale<sup>29,30</sup>. Cette vésicule d'un diamètre de 50-100  $\mu\text{m}$  est composée d'environ 18 molécules en triskèle qui polymérisent en réseau ce qui lui donne cet aspect d'un ballon de soccer (Fig. 3, page 9)<sup>29</sup>.



**Figure 3:** Vésicule tapissée de clathrine. Adaptée de l'image [membres.lycos.fr/.../feuille4.html](http://membres.lycos.fr/.../feuille4.html) <sup>32</sup>

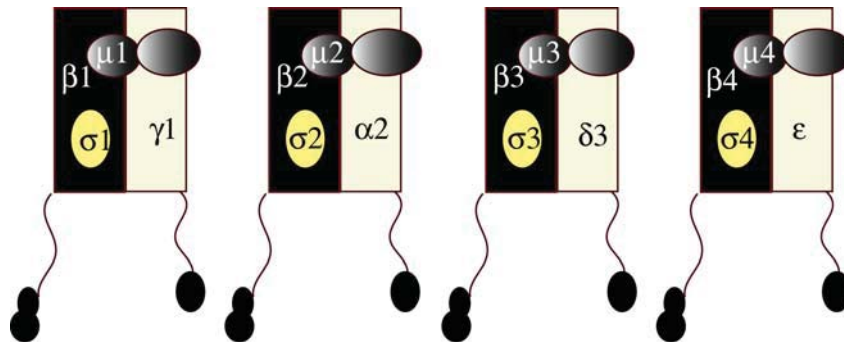
Ce manteau de clathrine enrobe la membrane plasmique dans laquelle sont enchâssées des protéines membranaires (e.g. récepteurs de la transferrine, des furines, des récepteurs au LDL). Un espace de 20 nm sépare la couche de membrane plasmique et la couche de clathrines. C'est précisément à cet endroit que se logent les protéines adaptatrices de clathrine (adaptines) qui sont essentielles à la formation du manteau de clathrine autour de la membrane.

### 1.6.2. Structure moléculaire des adaptines

Les adaptines (APs) les plus connues sont AP-1, AP-2, AP-3, et AP-4 (Tableau I). Les adaptines sont des complexes hétérotétramériques, constitués de quatre sous-unités chacune : deux grandes d'environ 90-130 kDa ( $\beta$ 1-4 avec soit  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ , ou  $\epsilon$ ), une moyenne d'environ 50 kDa ( $\mu$  1-4) et une petite de 157aa ( $\sigma$ 1-4) <sup>30</sup>.

Durant la biosynthèse des adaptines, les sous-unité  $\gamma$ 1- $\sigma$ 1 forment un hémicomplexe <sup>33,34,35</sup>. Étant donné la similarité de  $\mu$  et de  $\sigma$ , l'autre grande sous-unité de l'AP-1,  $\beta$ 1, formerait probablement le deuxième hémicomplexe en s'associant avec  $\mu$ 1. L'assemblage des deux hémicomplexes constituerait l'hétérotétramère AP-1 <sup>29</sup> (Fig. 4 ; page 10)





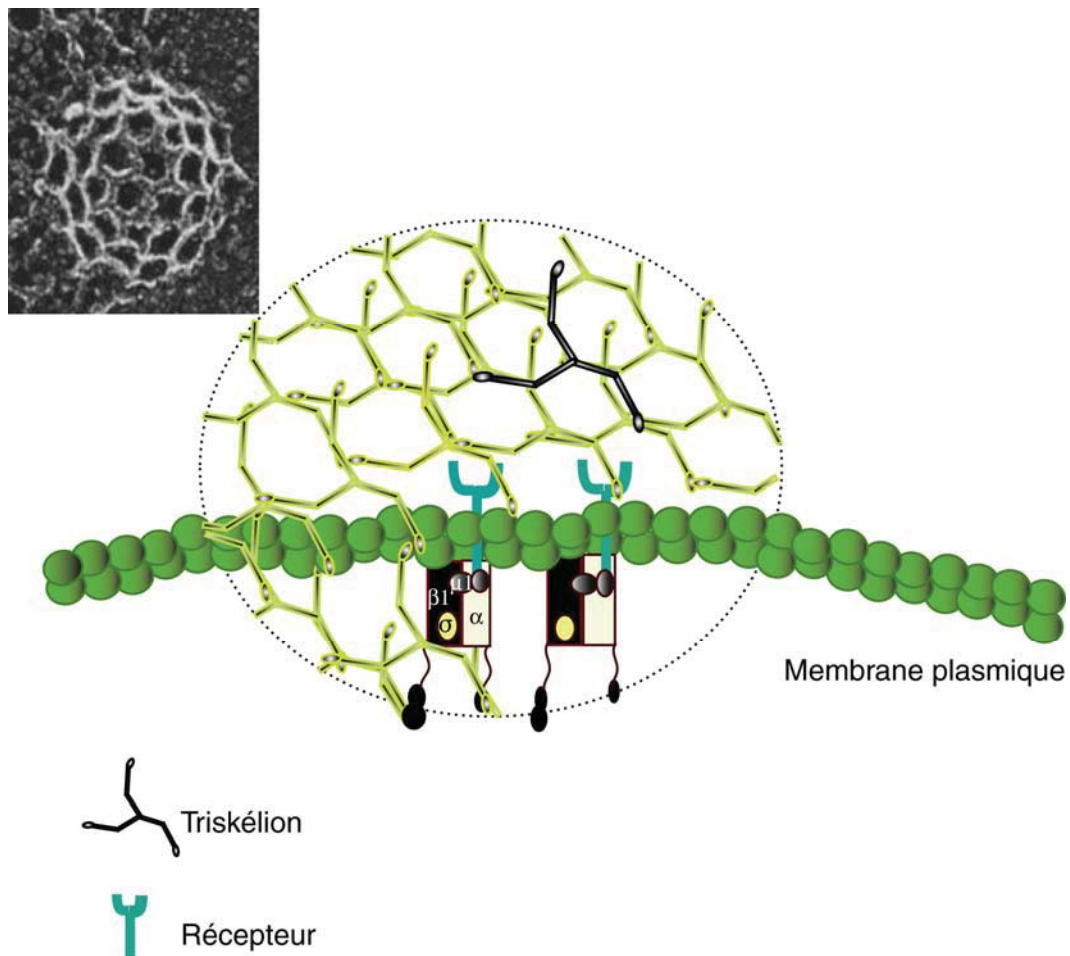
**Figure 4.** Représentation schématique hétérotétramérique des adaptines (Image modifiée à partir de l'article Boehm M, Bonifacino JS (2001) <sup>30</sup>

**Tableau I.** Les principaux complexes d'adaptines

COMPLEXE HÉTÉROTÉTAMÉRIQUE	PROTÉINE	GÈNE
AP-1		
	$\gamma 1$	APIG1
	$\gamma 2$	APIG2
	$\beta 1$	APIB1
	$\mu 1A$	AP1M1
	$\mu 1B$	AP1M2
	$\sigma 1A$	AP1S1
	$\sigma 1B$	AP1S2
	$\sigma 1C$	AP1S3
AP-2		
	$\alpha 1$	AP2A1
	$\alpha 2$	AP2A2
	$\beta 2$	AP2B1
	$\mu 2$	AP2M1
	$\sigma 2$	AP2S1

AP-3			
	$\Delta 3$		AP3D1
	$\beta 3A$		AP3B1
	$\beta 3B$		AP3B2
	$\mu 3A$		AP3M1
	$\mu 3B$		AP3M2
	$\sigma 3A$		AP3S1
	$\sigma 3B$		AP3S2
AP-4			
	E4		AP4E1
	$\beta 4$		AP4B1
	$\mu 4$		AP4M1
	$\sigma 4$		AP4S1

Les adaptines constituent les pièces majeures dans la formation de vésicules de transport. Elles recrutent les clathrines, par le biais de la sous-unité  $\beta$  (1-4) qui possède une séquence homologue à la séquence contenue dans le domaine terminal de la clathrine (Fig. 5, page 12). Ce complexe ne participe pas seulement à l'échafaudage des vésicules, mais il recrute également les protéines qui doivent être transportées dans les vésicules. Ces protéines exposent une séquence d'acides aminés qui servira de point d'ancrage afin d'assurer leur internalisation.



**Figure 5.** Représentation schématique du mécanisme d'action des adaptines

## 2. Projet de recherche

### 2.1 Problématique

L'EKV est une maladie rare de la peau, associée à des mutations dans des gènes codant pour des connexines (*GJB3*, *GJB4*). D'autres maladies similaires à l'EKV sont associées à des mutations dans des gènes codant respectivement pour des connexines (*GJB2*), la loricrine et la protéine de fusion membranaire SNAP29. Cependant, une proportion significative des familles atteintes ou porteuses d'EKV classique et ses variantes ne sont pas expliquées pas des mutations dans l'un ou l'autre de ces gènes <sup>5</sup>. Ceci suggère que d'autres gènes sont impliqués dans la pathogenèse de l'EKV et de ses variantes, notamment le syndrome de MEDNIK.

## 2.2 . Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse est qu'une perte de fonction du gène *APISI* est responsable du syndrome de MEDNIK, causée par une mutation fondatrice affectant le site d'épissage de ce gène. Cette hypothèse est basée sur les arguments suivants, à savoir :

- 1) le syndrome de MEDNIK est rare dans la population du Québec ;
- 2) tous les cas décrits à ce jour partagent un nombre limité d'ancêtres communs qui originent de la région de Kamouraska;
- 3) la structure particulière de cette population de l'est du Québec, où des effets fondateurs ont déjà été décrits pour d'autres maladies <sup>36</sup>.
- 4) un locus a été localisé sur le chromosome 7 pour ce syndrome, par cartographie de régions d'homozygotie; et finalement
- 5) une mutation potentielle affectant le site d'épissage du gène *APISI* a été identifiée chez tous les individus atteints et prédit une perte de fonction de ce gène ;

Cependant, étant donné la présence d'une seule mutation, nous ne pouvons exclure qu'il s'agisse d'un polymorphisme rare en déséquilibre de liaison avec la maladie. Par conséquent, la caractérisation fonctionnelle du gène *APISI* mutant est nécessaire afin de démontrer que ce gène est impliqué dans la pathogénèse de la maladie. Notre objectif général consiste à valider que la mutation *APISI* retrouvée dans le syndrome de MEDNIK cause une perte de fonction de ce gène, en utilisant le poisson zébré comme modèle de la maladie. À cette fin, les objectifs spécifiques de ce projet sont :

- 1) développer un modèle animal viable en inhibant la traduction de la petite sous-unité sigma du complexe AP1. Ceci sera effectué en injectant une séquence d'oligonucléotides anti-sens, dessinée spécifiquement pour le gène *APISI*;

- 2) vérifier la spécificité du knock-down du gène AP1S1 par différentes méthodes, notamment par une sur-expression de l'ARNm humain du gène *AP1S1*;
- 3) comparer du phénotype obtenu dans ce modèle avec les caractéristiques cliniques du syndrome de MEDNIK;
- 4) caractériser de façon plus détaillée les propriétés biologiques des phénotypes moteurs et cutanés associés à la perte de fonction du gène AP1S1 chez le poisson zébré ;
- 5) confirmer la perte de fonction du gène *AP1S1* occasionnée par la mutation qui cause le syndrome de MEDNIK en sur-exprimant de l'ARNm humain du gène AP1S1 mutant ;

### **2.3 Pertinence et retombées**

L'identification et la caractérisation de la protéine mutée impliquée dans le syndrome de MEDNIK vont améliorer notre compréhension de la maladie. Bien que cette maladie soit rare, même dans la population du Québec, la découverte des mécanismes moléculaires sous-jacents pourra permettre de comprendre en partie certaines composantes de ce syndrome qui sont plus fréquents dans la population générale, notamment le retard mental et la surdité. Grâce à une meilleure compréhension du mode de transmission et de l'étiologie de la maladie, nous serons en mesure d'offrir des conseils génétiques aux individus atteints ainsi qu'aux membres de leur famille, incluant des tests diagnostiques moléculaires.

## **3. Matériel et méthodes**

### **3.1 Caractérisation fonctionnelle de la mutation du gène AP1S1**

#### **3.1.1 Le poisson zébré, un modèle *in vivo* pour l'étude du gène AP1S1**

Le poisson zébré est un petit téléostéen d'eau douce et tropicale mesurant entre 2 et 5 cm à l'âge adulte. Ce modèle animal est de plus en plus utilisé dans les laboratoires de recherche puisqu'il offre plusieurs avantages, notamment un cycle de vie relativement court (temps de génération de trois mois), ce qui permet de réaliser des expériences de mutagenèse. Leur reproduction est simple et efficace, chaque jour une femelle peut pondre entre 100-200 œufs. Autre caractéristique très avantageuse, les embryons sont totalement transparents, ce qui permet une visualisation des organes au microscope à tous les stades de développement. Cette particularité a favorisé l'utilisation de marqueurs fluorescents dans ce modèle.<sup>37</sup>.

Le poisson zébré permet d'étudier la perte de fonction d'un gène ciblé notamment par l'injection d'une séquence d'oligonucléotides anti-sens modifiée (morpholino). Les modifications chimiques de cette séquence spécifiquement dessinée pour un gène cible produisent un morpholino qui est soluble, stable et capable de s'hybrider avec de faibles effets cytotoxiques<sup>38</sup>. Depuis quelques années, l'utilisation du morpholino a démontré que cette stratégie est très efficace dans toutes les cellules au cours des 50 premières heures du développement. Cette période inclut les processus fondamentaux de la segmentation et de l'organogenèse. L'injection de cette molécule se fait au centre du vitellus, qui diffusera vers les cellules en cours de division. L'injection est plus efficace lorsqu'elle est réalisée au stade de 1-2 cellules. Le morpholino est synthétisé de manière à ce qu'il puisse s'hybrider sur une vingtaine de bases à l'extrémité 5' de l'ARNm, autour du codon d'initiation de la traduction du gène cible. C'est de cette façon que la traduction du gène est inhibée, puisque le complexe ribonucléoprotéique, normalement assemblé près du site d'initiation de la traduction, ne peut se former ni progresser sur cet ARNm.

### **3.1.2 Inactivation du gène AP1S1 chez le poisson zébré**

Afin de vérifier si la mutation identifiée dans les familles atteintes du syndrome de MEDNIK est associée à une perte de fonction du gène AP1S1, nous avons bloqué la synthèse de la protéine codée par ce gène chez le poisson zébré. La technique utilisée s'effectue comme suit ;

1. dessin de la séquence d'oligonucléotide antisense qui bloque la synthèse de la protéine ;
2. injection dans l'œuf du morpholino au stade 2 à 4 cellules ;
3. observation du phénotype des larves à 24h et 48h.

Afin de vérifier la spécificité des effets de notre morpholino nous avons procédé à différentes analyses, notamment ;

1. des analyses de western blot et immunohistochimiques en utilisant l'anticorps anti-ap1s1 afin de vérifier la diminution ou l'absence de protéine ap1s1 produite par cet organisme;
2. une injection d'une séquence morpholino comprenant 5 paires de base de mésappariement ;
4. une co-injection du morpholino et de l'ARNm humain normal pour AP1S1 afin de vérifier si une sur-expression du gène AP1S1 humain peut compenser le knock down de la protéine endogène ;
5. finalement, afin d'imiter la mutation qui crée un codon stop prématuré, nous avons injecté un deuxième morpholino ciblant la jonction entre l'intron 2 et l'exon 3.

### **3.2 Caractérisation du phénotype morphologique chez le morphant**

Nous avons d'abord vérifié si le phénotype n'était pas causé par une augmentation de la mort cellulaire. À cette fin, nous avons procédé à une analyse *in vivo* en utilisant un marquage avec de l'acridine orange. Il était important de vérifier si la malformation cutanée n'était pas causée par un défaut dans le patron de différenciation précoce de l'épiderme en faisant un marquage des noyaux des kératinocytes basaux. Afin de vérifier si les kératinocytes démontraient des défauts spécifiques liés à l'adhérence, nous avons procédé à un marquage de la cadhérine

(membrane cellulaire) et de la laminine (membrane basale) en utilisant les anticorps respectifs.

### **3.3 Caractérisation du comportement et de la moelle épinière chez le morphant.**

Afin de comparer les désordres entre les larves injectées et les sauvages, les deux groupes ont été filmés 48 après la fertilisation. Puisque les larves injectées démontaient de sérieux problèmes moteurs, le développement de la moelle épinière chez les morphants a été investigué. Le premier marquage a été réalisé avec un anticorps anti-tubuline acétylée afin de marquer les axones. Afin de vérifier quelle population neuronale était affectée, un marquage des par des anticorps anti-PAX2 et anti-BH9 a été effectué afin de marquer les motoneurones et les interneurones respectivement.



#### **4. Disruption of *AP1S1*, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord**

Alexandre Montpetit\*<sup>1</sup>, Stéphanie Côté\*<sup>2</sup>, Edna Brustein\*<sup>3</sup>, Christian A. Drouin <sup>4</sup>, Line Lapointe <sup>2</sup>, Michèle Boudreau <sup>1</sup>, Caroline Meloche <sup>2</sup>, Régen Drouin <sup>5</sup>, Thomas J. Hudson <sup>6</sup>, Pierre Drapeau <sup>3</sup>, Patrick Cossette <sup>2</sup>.

1) McGill University and the Genome Quebec Innovation Centre, Montréal, H3A 1A4, Québec, Canada. 2) Centre d'excellence en neuromique de l'Université de Montréal, CHUM Research Center-Notre Dame Hospital, Université de Montréal, Montréal, H2L 4M1, Québec, Canada. 3) Department of Pathology and Cell Biology, Faculté de médecine and Groupe de recherche sur le système nerveux, Université de Montréal, Montréal, H3C 3J7, Québec, Canada. 4) Department of Dermatology, Centre Hospitalier Régional Grand-Portage, Rivière-du-Loup, G5R 2A4, Québec, Canada. 5) Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, J1H 5N4, Québec, Canada, 6) Ontario Institute for Cancer Research, Toronto, M5G 0A3, Ontario, Canada.

Corresponding author:

Patrick Cossette MD, PhD CHUM-Hôpital Notre-Dame

1560 Sherbrooke est Montréal, Québec

H2L 4M1 Tel: (514) 890-8237 Fax (514) 412-7554

#### 4.1 Apport des coauteurs

Design et conception des expériences : Alexandre Montpetit, Stéphanie Côté, Edna Brustein, Thomas J. Hudson, Pierre Drapeau, Patrick Cossette.

Réalisation des expériences : Alexandre Montpetit, Stéphanie Côté, Edna Brustein, Line Lapointe, Michèle Boudreau, Caroline Meloche.

Analyse des données : Alexandre Montpetit, Stéphanie Côté, Edna Brustein, Caroline Meloche, Patrick Cossette.

Contribution matérielle (réactif, matériel, outils d'analyse) Chrisitan A. Drouin, Régen Drouin, Thomas J. Hudson, Pierre Drapeau, Patrick Cossette.

Écriture du manuscrit : Alexandre Montpetit, Stéphanie Côté, Edna Brustein, Chrisitan A. Drouin, Caroline Meloche, Pierre Drapeau, Patrick Cossette.

#### 4.2 Acknowledgments

We are grateful to G. Laliberté and M. Drita for animal care, and P. McPherson for comments. We also thank L. Traub for providing us with an AP1S1 antibody. Finally, we thank F. Gros-Louis for the design of the morpholino.

#### 4.3 Abstract

Adaptor protein (AP) complexes regulate clathrin-coated vesicle assembly, protein cargo sorting and vesicular trafficking between organelles in eukaryotic cells. Because disruption of the various subunits of the AP complexes is embryonic lethal in the majority of cases, characterization of their function *in vivo* is still lacking. We describe here the first mutation in the human *AP1S1* gene, encoding the small subunit  $\sigma 1A$  of the AP-1 complex. This founder splice mutation, which leads to a premature stop codon, was found in four families with a unique syndrome characterized by mental retardation, enteropathy, deafness, peripheral neuropathy, ichthyosis, and keratoderma (MEDNIK). To validate the pathogenic effect of the

mutation we knocked down *Aplsl* expression in zebrafish. The knockdown phenotype consisted of perturbation in skin formation, reduced pigmentation and severe motility deficits due to impaired neural network development. Both neural and skin defects were rescued by co-injection with wild-type (WT) human *APISI* mRNA, but not by co-injecting the truncated form of *APISI*, consistent with a loss-of-function effect of this mutation. Together, these results confirm *APISI* as the gene responsible for MEDNIK syndrome and demonstrate a critical role of *APISI* in development of the skin and spinal cord.

#### 4.4 Introduction

Protein trafficking between organelles in eukaryotic cells is mainly mediated by clathrin-coated vesicles and their assembly requires adaptor protein (AP) complexes<sup>39,40</sup>. The AP complexes also determine protein cargo selection for transport between the trans-Golgi network (TGN), endosomes, lysosomes and the plasma membrane<sup>29,30</sup> and clathrin is important in establishing the basolateral domain<sup>41</sup>. Four ubiquitous AP complexes (AP 1-4) have been characterized and each of them is composed of four subunits. The large subunits ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  or  $\epsilon$  and  $\beta$ 1-4) mediate binding to the target membrane and clathrin recruitment. The small subunit  $\sigma$  is part of the AP complex core and has been suggested to contribute to the stabilization of the complex, in conjunction with the medium subunit  $\mu$ , which is primarily involved in protein cargo sorting (<sup>29,30,41,31</sup>). Although the molecular understanding of the role of AP complexes in vesicular transport is progressing rapidly, the evidence for their role *in vivo* and in disease is more limited<sup>30,41,31,42</sup>. Knockdown or knockout of various AP-complex subunits has been attempted in different animal models, including the mouse  $\gamma$  and  $\mu$  subunits and *C. elegans*  $\sigma$  subunits of AP-1A<sup>30,41,31,42</sup>. However, these are all embryonic lethal, further emphasizing the importance of these complexes for appropriate development. So far, a few but severe genetic disorders caused by mutations in genes encoding AP complex components have been described in humans. One of the most studied involves a mutation in the  $\beta$ 3A subunit of AP-3 which underlies the Hermansky–Pudlak syndrome 2 (HPS-2)<sup>43</sup>. This syndrome is characterized by oculocutaneous albinism, bleeding diathesis with absence of platelet dense bodies and abnormal depositions of ceroid lipofuscin in various organs. Mutated *AP3B3A* is believed to cause abnormal formation of

intracellular vesicles from the trans-Golgi network or late endosomes, and probably mistrafficking of lysosomal proteins<sup>43, 31</sup>. Recently, three mutations in *APIS2*, encoding the  $\sigma$ 1B isoform of AP-1, have been associated with X-linked mental retardation<sup>44</sup>. As AP-1 is associated with synaptophysin and the vesicular acetylcholine transporter, it was suggested that these mutations cause abnormal synaptic development and function. Erythrokeratoderma variabilis (EKV) is an autosomal dominant disease characterized by erythematous lesions and hyperkeratosis caused by mutations in two epidermally expressed connexin genes, *GJB3* (Cx31) and *GJB4* (Cx30.3)<sup>5,9</sup>. Because a significant proportion of EKV families do not have mutations in *GJB3* and *GJB4*, additional EKV genes remain to be identified<sup>5</sup>. We previously identified a new locus on chromosome 7q22 for an atypical form of EKV, in families with EKV lesions, as well as lamellar and erythrodermic ichthyosis (Supplementary Fig.1),<sup>8</sup>. In addition to the skin lesions, affected individuals from these families exhibit severe psychomotor retardation, peripheral neuropathy, and sensorineural hearing loss, together with elevated very-long-chain fatty acids and severe congenital diarrhea (Supplementary Table 1). Given the similarities with the more recently described CEDNIK syndrome<sup>26</sup> (13) we rather used the related acronym MEDNIK for mental retardation, enteropathy, deafness, neuropathy, ichthyosis, and keratoderma to designate this unique syndrome. These MEDNIK families live in a relatively isolated population descended from a limited number of ancestors, and the gene responsible for this autosomal recessive syndrome was mapped by identifying a common homozygous region<sup>8</sup>. In this study we present a novel splice mutation in human *APIS1*, a ubiquitously-expressed gene encoding the small subunit  $\sigma$ 1A of AP-1, in four families with MEDNIK syndrome from the Quebec population. This founder mutation is predicted to cause the skipping of exon 3, leading to a premature stop codon at the beginning of exon 4. To further validate the *APIS1* mutation, we knocked down native *Ap1s1* using antisense morpholino oligonucleotides (AMOs) in the developing zebrafish and examined the ability of wild-type (WT) and mutated human mRNA to rescue the developmental phenotype. Overall, our results confirm that mutation of the *APIS1* gene causes MEDNIK syndrome and suggest a critical implication for the *APIS1* gene in development of the skin and spinal cord.

## 4.5 Results

### 4.5.1 Identification of mutated *APISI* in individuals with MEDNIK

The region harbouring the causative gene for MEDNIK syndrome, previously named EKV3, was recently mapped to a 6.8 Mb segment of chromosome 7p using a genome wide single nucleotide polymorphisms (SNP) panel in 3 families originating from the Bas-St-Laurent region in the province of Quebec (Canada), sharing a common ancestor at the 10th or 11th generation<sup>8</sup>. We genotyped a fourth pedigree, which enabled us to reduce the critical region to 5.3 Mb between markers D7S2539 and D7S518 (data not shown). Among the candidate genes mapping to that interval, *GJE1* (encoding a connexin) and *CLDN15* (encoding a claudin) were sequenced but no mutation was found. Recently, a mutation in a SNARE protein (SNAP29) was associated with cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis and palmoplantar keratoderma (CEDNIK)<sup>26</sup>. Since clinical manifestations of CEDNIK show striking similarities to the MEDNIK syndrome described here, we hypothesized that a mutation in *APISI*, a functionally related gene mapping to the candidate interval, may cause the disease. By sequencing the gene, we identified a mutation in the acceptor splice site (A to G) of exon 3 in all individuals with MEDNIK (IVS2 -2A >G). This splice mutation is predicted to cause skipping of exon 3, leading to a premature stop codon at the beginning of exon 4 (Fig. 6 D, page 38). All parents and an unaffected sibling were heterozygous for this mutation (Fig. 6 B and C, page 38). This mutation was not observed in 180 CEPH controls. In order to confirm the loss of exon 3, RT-PCR analyses were performed on mRNA isolated from fibroblasts using primers located in exons 2 and 4. As expected, a single band was observed in the controls. In contrast, two bands were detected in the carriers and patients (Fig. 6 C, page 38). Direct sequencing confirmed that the lower band corresponded to an mRNA isoform lacking exon 3. The higher band from the affected individuals corresponded to another RNA isoform, in which a cryptic splice acceptor site located 9 bp downstream of the start of the third exon was used. The resulting in frame protein is thus predicted to lack only three amino acids (Fig.6 D, page 38). The full-length *APISI* mRNA species was not detected in these individuals. A semi-quantitative RT-PCR was performed on RNA isolated from mutation carriers and

controls fibroblasts. Whereas heterozygous carriers had wild-type mRNA levels ranging from 40 to 75% of the expected value, the relative expression levels of both mutant isoforms was very low in affected individuals, corresponding to less than 10% of the expected amount of RNA (Fig. 6 C, page 38). Western blot analysis of skin proteins showed faint expression of the AP1S1 protein in affected individuals, suggesting partial expression of the isoform lacking three amino acids (Supplementary Fig.1 C, page 42). The histological analysis revealed an epidermal hyperplasia accompanied by hypergranulosis and compact hyperkeratosis (Supplementary Fig. 1 B, page 42).

#### 4.5.2 *Ap1s1* knockdown in zebrafish: morphological phenotype

To validate whether the *AP1S1* mutation found in MEDNIK patients alters the biological function of this gene, we first knocked down *Ap1s1* in zebrafish by inhibiting mRNA translation using an AMO<sup>38</sup> targeting its start codon (Fig. 6 D, page 38). The morphological deficits of 48 hours post-fertilization (hpf) knocked down (KD) larvae (n=68/91) are summarized in Fig.7, page 39, as the treatment was embryonic lethal at later stages. The 48hpf *Ap1s1* KD larvae were well formed but smaller in size compared to WT, and had reduced pigmentation (Fig.7 A and 7 B page 39). In addition, the KD larvae revealed prominent changes in the skin organization which were most visible in the fins (Fig.7 B and E, page 39). In contrast to the well-defined, fan-like ray structure of the WT caudal fin, the fin of the *Ap1s1* KD larvae was disorganized with rounded-up cells conferring a rough outline. Immature WT larvae did not show abnormal morphology of the skin and fin, suggesting that this phenotype is specific to the morpholino treatment rather than a general developmental retardation. The specificity of the AMO effect was confirmed by using *Ap1s1* Western blotting and immunolabelling in wholemount larvae. With both methods we observed a decrease in the intensity of the *Ap1s1*-specific labeling in the *Ap1s1* KD larvae compared to the WT (Fig.7 D inset, Fig 7 F and Fig 7 C, page 39). Also, larvae injected with a control AMO (5 mispaired bases) did not show significant differences compared to WT (n=26/26, Supplementary Fig. 2 D, page 43). Finally, in order to mimic the splice mutation found in individuals with EKV3, we designed a morpholino targeting the *Ap1s1* intron 2 acceptor splice site (Fig. 6 D, page 38, Supplementary Fig. 2 G, page 43, n=32/58). In this latter experiment, we

found the same abnormal skin and fin morphology as observed by using AMO targeting the *Apl1s1* start codon, although the phenotype was less penetrant. To determine if an increase in cell death underlies the skin phenotype in the KD embryo, we stained these larvae with the vital dye acridine orange <sup>45</sup>. We did not observe a difference compared with control (not shown), suggesting that the skin and fin disorganization was not due to an initial outgrowth followed by tissue degradation. We further tested whether the skin malformation was due to a problem in early epidermal patterning by using immunolabeling for p63, a marker of basal keratinocyte nuclei <sup>46</sup>. Despite the prominent changes in the size and the shape of the tail, p63-positive keratinocytes were present both in WT (Fig. 8 A, page 40) and KD larvae (Fig. 8 B, page 40). To look for a change in the population of proliferating cells, we performed immunolabelling with the phosphorylated-histone-H3 (PH3) antibody to visualize cells undergoing histone modification during mitosis, which did not reveal any obvious difference between the KD and control larvae (not illustrated). Similar results were obtained with co-immunostaining against p63 and PH3, suggesting unaffected proliferation level of basal keratinocytes population in the KD larvae (not illustrated). To further investigate whether the keratinocytes in the KD larvae exhibit specific abnormalities, we immunolabeled WT and KD larvae for laminin (Fig 8 C, D page 40) and for cadherin (Fig. 8 E and F, page 40). Laminins, in particular laminin 5, are synthesized by keratinocytes and are their main anchor to the basement membrane <sup>47</sup>, while cadherins are localized to the keratinocyte cell membrane and are essential in maintaining cell-cell adhesion <sup>48</sup>. In the WT, laminin was detected at the outer edges of the fin (Fig. 8 B, page 40) while in the KD larvae (Fig 8 C, page 40) the detected laminin appeared diffuse, with an abnormal localization. Furthermore, in the KD larva, cadherin immunolabeling was less obvious at the cell membrane of keratinocytes double labeled with cadherin (green) and p63 (orange) (Fig. 8 F, page 40). In contrast, the localization of cytokeratin, a major cytoskeletal protein expressed exclusively in epithelial cells <sup>49</sup>, <sup>50</sup> seemed to be preserved in KD larvae (Fig. 8 G and H, page 40)

#### 4.5.3 Behavioural deficits and impaired spinal cord development in *Apl1s1* knockdown larvae

At 48 hpf WT larvae normally respond to touch by swimming, which is characterized by alternating tail movements with a beat frequency of about 30Hz (Fig. 9 A, page 41)<sup>51,52</sup>. In contrast, *Ap1s1* KD larvae reacted to touch by tail coils (Fig. 9 F, page 41), an embryonic motility pattern that usually disappears around 24 hpf<sup>51</sup>. Since the KD larvae exhibited severe motor impairment, we further investigated the spinal cord neural organization. An anti-acetylated tubulin staining revealed a reduction in axonal processes in the spinal cord of *Ap1s1* KD larvae (Fig. 9 G, page 41) compared to the WT (Fig. 9 B, page 41). To quantify the number of newly born neural cells, whole mount 48 hpf larvae were labeled using anti-HU as this RNA binding protein is found in neuronal cells leaving the mitotic cycle<sup>53</sup>. The number of newly born neurons in KD larvae (n=3, 41±3) significantly decreased to 51% of control, WT, levels (Fig. 9 C, and H; page 41, n=3, 81±9, p<0.001,). We also quantified the progenitor population in the spinal cord using an anti PH3, but we did not find a significant change between *Ap1s1* KD and control larvae groups (n=6 each, not illustrated), nor did we observe significant cell death upon staining with acridine orange. To study which population of neurons was specifically affected, we labelled interneurons and motoneurons by using anti-Pax2, which labels a large subset of early differentiating interneurons<sup>54</sup> and anti-HB9, a homeobox gene necessary for motoneuron differentiation<sup>55</sup>. Interestingly, whereas the number of motoneurons was unchanged (Fig. 9 D and I, page 41 n=3 each p=0.42,), we observed a 46 % reduction in the number of interneurons in *Ap1s1* KD larvae compared to the WT (Fig. 9 E and J; page 41, n=3 each, WT 28±1.5, KD 13±0, p<0.001). This behavioral and spinal phenotype was specific to the morpholino treatment and not just a reflection of general developmental retardation, as reflected by the sparing of motoneurons and loss of interneurons, which is not observed during normal development.

#### 4.5.4 Overexpression of human mRNA rescues *Ap1s1* function in AMO larvae

All larvae co-injected with human wild type human *AP1S1* mRNA and *Ap1s1* AMO exhibited restoration of the skin organization, pigmentation (Fig. 7 G, H, page 39), as well as swimming behavior (n=35/35 fishes). Conversely, larvae co-injected with human *AP1S1*-exon3 mRNA and *Ap1s1* AMO showed skin and motor deficits similar to those observed in *Ap1s1* KD larvae, suggesting a loss of function of this



truncated form of the protein (Supplementary Fig. 2 F, page 43 n=24/24). However, co-injection of the human alternative mutant *AP1S1*-9bp mRNA together with the AMO rescued the phenotype (Supplementary Fig. 2 E, page 43 n=19/19 fishes), suggesting that this protein isoform lacking 3 amino acids remains functional. Larvae injected with the mismatch morpholino oligonucleotide were similar both morphologically and behaviorally to the WT (Supplementary Fig. 2 D, page 43 n=26/26).

## 4.6 Discussion

In this study, we demonstrated that the autosomal recessive MEDNIK syndrome, described in the population of Quebec, is caused by a founder mutation in *AP1S1*. More specifically, we have shown that the A to G mutation in the acceptor splice site of exon 3 of *AP1S1* (IVS2-2 A >G) was associated with skipping of this exon, leading to a premature stop codon. To our knowledge, this is the first report of a mutation in the *AP1S1* gene. We demonstrated that the IVS2-2 A >G mutation produced a loss of function effect in zebrafish. These findings support the conclusion that the *AP1S1*-exon 3 mutation is indeed pathogenic. Our results are consistent with the recent description of a mutation in SNAP29, a regulator of vesicle fusion to target membrane, found in CEDNIK syndrome. Indeed, the CEDNIK syndrome shows striking similarities to MEDNIK and mutated genes in these two diseases play a role in vesicular trafficking<sup>26</sup>. Recently, mutations in the  $\sigma$ 1B subunit of AP-1 (*AP1S2*) were identified in patients with X-linked mental retardation<sup>44</sup>. In contrast to the *AP1S1* mutation described here, these individuals do not exhibit defects in other organs. Presumably, the loss of the  $\sigma$ 1B subunit can be compensated in tissues outside of the central nervous system. Even though the mutations found in *AP1S2* are predicted to cause premature stop codons in exons 2 and 3, it has not been determined if functional protein products were present in the affected individuals.

### 4.6.1 *In vivo* characterization of AP1S1 function

Little is known about the  $\sigma$  subunit role in AP complex formation and function *in vivo*. It is suggested that AP1S1 contributes to the AP complex core stabilization<sup>42</sup>,<sup>34</sup>. Furthermore, in AP-1 and AP-3, the  $\sigma$  subunit is suggested to interact with

“dileucine based” recognition signal on cargo proteins, in combination with the  $\gamma$  or the  $\sigma$  subunit respectively. Therefore, this implicates the  $\sigma$  subunit in protein sorting as well<sup>56</sup>. However, attempts to interfere with AP1S1 function *in vivo* were not successful so far, as they resulted in embryonic lethality. Similar results were obtained by interfering with most of the other subunits of the AP-1 complex, further emphasizing its importance for appropriate development<sup>30, 41, 31, 42</sup>. In this study, we knocked down *Ap1s1* in zebrafish and were able to rescue the morphological and behavioral phenotypes observed in KD larvae by co-injecting WT human *AP1S1* mRNA, which further support the specificity of the *Ap1s1* knockdown. The remaining levels of Ap1s1 protein may explain viability in zebrafish, at least for the first 48 hours of development. However, because some of the AP complexes have overlapping function, compensation by other AP complexes cannot be excluded<sup>42, 57</sup>. Nevertheless, since the *Ap1s1* KD larvae exhibit severe deficits, neither residual levels of AP-1A and B, nor the activity of other AP complexes were sufficient for appropriate development of many cells types (skin, pigment and neural). In this study, we demonstrate for the first time that disruption of an AP1 subunit, more specifically the  $\sigma$ 1A subunit, causes perturbation in epithelial cell development *in vivo*. The presence of p63 immuno positive basal keratinocytes in the KD larva suggested that knocking down *Ap1s1* did not interfere with early epidermal patterning. The skin phenotype was not accompanied by an increased cell death or in the level of proliferating basal keratinocytes. Carney *et al.*<sup>58</sup> observed an increase in proliferating basal keratinocytes in zebrafish mutants suffering from severe epithelial disintegration and suggested that this phenomenon is a secondary consequence of inflammation and consequent loss of epithelial integrity. The lack of increased proliferation in our study could be explained by the presence of sufficient residual laminin to provide some anchoring for the keratinocytes, allowing the maintenance of some epithelial properties. However these residual levels of laminin appeared insufficient for appropriate basement membrane development. Interestingly, zebrafish embryos carrying a mutation in the gene encoding for laminin 5 suffer from severe deficits in fin formation due to disruption in basement membrane integrity<sup>59</sup>. In AP1S1 KD larvae, we also found an alteration in the localization of cadherin in basal keratinocytes, which was not accompanied by changes in cytokeratin localization, suggesting that this component of epithelial cells cytoskeleton remain unaffected by *AP1S1* dysfunction. Interestingly, the nature of

the specific adaptor complex that recognizes the cadherin dileucine sorting motif is unknown, although AP-1 is a candidate<sup>48</sup>. Based on these observations, we suggest that *Aplsl*/knockdown resulted in failure to localize cadherin to the basolateral cell membrane which, together with an abnormal pattern of expression of laminin, lead to a loss of epidermal layer integrity.

#### 4.6.2 Behavioral deficits and abnormal neural development

The well formed 48hpf *Aplsl* KD larvae showed a severe behavioral phenotype. Instead of reacting to touch by swimming, the KD larvae coiled in a motility pattern distinctive of younger embryos. Consistent with this observation, detailed examination of the spinal cord revealed an abnormal development. The extent of axonal processes was diminished and the number of newly born neurons was reduced to half of the WT levels due mainly to a decrease in the interneuron population, but not in motoneurons. Interestingly, as observed in the skin, no change was seen in the levels of neuronal progenitors in the spinal cord. There is mounting evidence that AP complexes such as AP-2 and AP-3 are implicated in neural function<sup>60</sup>. For example, mice with knockout of the AP-3  $\mu$ 3B subunit are susceptible to epileptic seizures because of deficient GABAergic vesicle formation and function<sup>61</sup>. Also, *mocha*, one of the mouse models for Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) in which the  $\delta$  subunit of AP-3 is mutated, suffer from neurological disorders<sup>62</sup>. The loss of AP-3 in these mice affected spontaneous and evoked neurotransmitter release in hippocampal mossy fiber synapses<sup>63</sup>. AP-2 is implicated in selective endocytosis and recycling of synaptic vesicles and also of receptors and transporters from the plasma membrane of nerve terminals<sup>60, 64</sup>. For example, internalization of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptors by binding to AP-2 is essential for N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)-induced long-term-depression in the hippocampus and therefore to synaptic plasticity<sup>65, 66</sup>. In turn, little is known about AP-1 function in neurons, although it was reported to interact with synaptophysin, one of the most abundant proteins in synaptic vesicles<sup>67</sup>, as well as with vesicular acetylcholine transporter<sup>68</sup>. Moreover, AP-1 binds to the ubiquitous microtubule-associated motor protein KIF13A, a member of a protein family implicated in neuronal transport of membranous organelles, synaptic vesicles and proteins from the cell body to the axons and dendrites<sup>69, 70</sup>. Mice with

mutations in members of this protein family (KIF1A, KIF1B $\beta$ ) show reduced synaptic vesicles in the synaptic terminals and suffer from sensory-motor deficits<sup>71</sup>. Also, mutations in *KIF1B $\beta$*  cause Charcot-Marie-Tooth hereditary peripheral neuropathy type2A in humans<sup>71</sup>. It is thus possible that AP1S1, in addition to its possible implication in synaptic vesicles regulation and formation, could be implicated in their transport toward the neural processes. Although not much is known about the precise role of AP-1 in the developing central nervous system, we show here that the disruption of the AP-1 function is associated with substantial perturbation of a subset of spinal interneuron differentiation.

#### 4.6.3 The zebrafish *Aplsl* knockdown and its contribution to understanding of the MEDNIK syndrome

*Aplsl* KD larvae exhibit abnormal development of neurons and skin cells, a phenotype that shows similarities to the clinical manifestations observed in individuals with MEDNIK. Based on the observation of reduced neurogenesis we have made in zebrafish, we speculate that MEDNIK syndrome in affected patients is caused by an impaired development of various neural networks, including the spinal cord (ataxia and peripheral neuropathy) and possibly the brain (microcephaly and psychomotor retardation) and inner ear (sensorineural deafness). We also hypothesize that disruption of AP1S1 in humans may be associated with more extensive perturbation of organogenesis. Indeed, growth retardation, digestive tract malformations and dysfunction (chronic diarrhea), and elevation of very long chain fatty acid observed in individuals with MEDNIK syndrome might reflect more widespread perturbation of vesicular transport and of epithelial cell development. One intriguing question is why the *AP1S1*-exon 3 mutation is not lethal in homozygous individuals with MEDNIK. Indeed, overexpression of human *AP1S1*-exon3 mRNA failed to rescue the phenotype observed in *Aplsl* KD larvae, suggesting a loss of function of this critical protein. However, co-injection of the *AP1S1*-9 bp human mutant mRNA with AMO, the alternative RNA species detected in our MEDNIK patients, rescued the phenotype, suggesting that this alternative splicing results in a functional protein. The expression of that protein isoform in patients may thus explain their viability. The fact that the *AP1S1*-9bp mRNA is expressed at low levels (less than 10% of normal levels in fibroblasts) could explain

why it is not sufficient to sustain normal development and function and further highlight the important role of AP1S1 in normal development. Furthermore, the expression levels of the different AP1S1 isoforms may vary from one tissue to another, as well as between individuals, thereby contributing to the variability of the phenotype. Overall, these observations in zebrafish, in light of previous *in vitro* studies<sup>60, 63, 72, 73, 74</sup> suggest that AP1S1 and AP-1 complex are most likely implicated in appropriate protein sorting and transport. Interference with these pathways could therefore result in perturbation of cellular organization and be detrimental for the development of specific cell subpopulations, as we observed respectively in the skin and the spinal cord of the *Ap1s1* KD larvae. The results suggest avenues for both basic and clinical research, in order to better understand the mechanisms underlying MEDNIK and related neurocutaneous syndromes.

## 4.7 Material and methods

### 4.7.1 Patients and Methods Patients and Biological materials

Seventeen individuals from four families including three affected children were ascertained and examined as described<sup>8</sup>. Genetic material of affected individuals and unaffected siblings and parents was isolated from blood lymphocytes at Le Service de Dermatologie du CHRGP de Rivière-du-Loup and Le Service de Génétique du CHUQ (Hôpital St-François d'Assise). Fibroblast cell cultures were obtained from 3mm punch biopsies from patients, relatives or healthy controls and were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with fetal calf serum 10%. The study was approved by the Institutional Review Board of the Hôpital St-François d'Assise and informed consent was obtained from all family members.

### 4.7.2 DNA amplification and mutation analysis

Coding regions of *AP1S1* were amplified by PCR from genomic DNA (primer sequences are available upon request). Total RNA was extracted from cultured primary fibroblasts harvested from skin biopsy samples using standard protocols. cDNA was prepared using random hexamers and standard procedures, and a

fragment from exon 2 to exon 4 of *AP1S1* was amplified with the primers used for the Taqman exon 3 assay (see below). All DNA templates were amplified using HotStar Taq polymerase (Qiagen, Valencia, CA) and standard conditions (95°C for 5 min; 40 cycles of 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec and 72°C for 10 min.). Amplicons were sequenced in both directions using the same primers than for PCR.

#### 4.7.3 RT-PCR analyses

Taqman assay was performed on cDNA (obtained from fibroblast isolated RNA) using the Taqman kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and according to the manufacturer's conditions. For the exon 2 assay, 300 nM of these PCR primers, AP1S1\_exon2 F, 5'-gagctcatgcaggtgtcct-3'; AP1S1TaqR, 5'-AGTTGAAGATGATGTCCAGCTC-3', and 200 nM of the probe, AP1S1TaqP\_exon2, 5'FAM-CCTGGAGTGGAGGGACCTCAA-TAMRA3', were used. For the exon 3 assay, 300 nM of these PCR primers, AP1S1 TaqF, 5'-TGGAGGGACCTCAAAGTTGT-3' and AP1S1 TaqR, 5'-AGTTGAAGATGATGTCCAGCTC-3', and 200 nM of the probe, AP1S1 TaqP, 5'FAM-CACACTGGAGCTGATCCACCG ATAC-TAMRA3', were used. All primers were designed using NM\_001283 as the reference sequence. As an expression control for use in quantification, universal 18S primers were included in the same reaction mixes. PCR conditions were: 95°C for 10 min, 45 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 56°C, and 30 sec at 72°C. Reactions were cycled on the 7900 HT Real-time PCR instrument (Applied Biosystems). Relative expression for each sample was evaluated by using the difference in the threshold cycle ( $\Delta C_t$ ) value to achieve a similar level of fluorescence. 18S relative expression was used to normalize for the cDNA quantity of each sample. All values correspond to an average of three independent experiments.

#### 4.7.4 Cloning of human *AP1S1*

We designed primers (*AP1S1*-5'-TAAGCGGATCCA TGATGCGGTTCATGCT ATTATTC, and *AP1S1*-3'-GTAAGCCTCGAGTCAGT GGGAAAAGGG GA AAGTGG) to amplify the complete 21 open reading frame of *AP1S1*-variant 1 from a

human brain cDNA library (Marathon ready, BD Biosciences Clontech), using *Pfu* Polymerase (Stratagene). The same primers were used on patient's cDNA to get the mutated alleles, using Advantage 2 Polymerase (Clontech). By using BamHI and XhoI restriction sites introduced into the primer sequences, the PCR products was directionally cloned into pCS2+ vector. All constructs were completely sequenced to confirm the mutations, as well as to exclude any other variants that could have been introduced during the PCR amplification. Capped sense mRNAs were synthesized from pCS2+ by using the mMESSAGING mMACHINE SP6 kit (Ambion).

#### 4.7.5 Histology

Skin biopsies were also used to perform histological analysis. The samples were fixed in formalin 10% and embedded in paraffin. Sections of approximately 5  $\mu$ m were cut by using cryostat, and stained with haematoxylin and eosin.

#### 4.7.6 Morpholino knockdown of *Ap1s1* in zebrafish

Experiments were performed on zebrafish (*Danio rerio*) larvae raised at 28.5°C according to previously established procedures<sup>37</sup> by Westerfield, M. (1995), and in compliance with Canada Council for Animal Care and institutional guidelines. To knockdown the function of the gene encoding for the  $\sigma$ 1A subunit of AP-1 in zebrafish, which shares 91% identity with the human AP1S1 protein, an AMO (Gene Tools) was designed to target the **initial codon** of zebrafish *Ap1s1* gene (5'-ACAGAAGCATAAAGCGCATCAT TTC- 3'), which differs in sequence from human *AP1S1*. In addition, a second morpholino was designed to target the acceptor splice site (intron 2) of the zebrafish *Ap1s1* gene, 5'-GACTAGCATAACCTACGTAAACACAC-3'. All AMO preparation and injection procedures were according to previously described protocols (13). The specificity of our AMO was verified by injection of a control, 5 base pair MMO (5'-ACACAAGGATAAACCGCATGATATC- 3') as well as by Western blotting as will be described below. After establishing the AMO phenotype (1mM), rescue experiments were performed in which both AMO (1mM) and human *AP1S1* WT or mutated mRNA (110 ng) were injected.

#### 4.7.7 Western Blot

Skin biopsies were obtained from normal individual, carrier and patients (lesional and non-lesional skin). The samples were frozen in liquid nitrogen and homogenized in lysis buffer (RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA pH 8.0, Triton 1%, Sodium deoxycholate 1%, SDS 0.1%, Protease inhibitors (complete mini, Roche), Aprotinin 10µg/ml, Leupeptine 10 µg/ml, phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) 1 mM). The lysates were centrifuged at 12 000g for 20 min at 4°C. To quantify gene knockdown, thirty 48 hpf WT and *Ap1s1* KD larvae were dechorionated and anaesthetized in 0.2%MS-222 (Sigma) and then homogenized in lysis buffer (150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 50 mM Tris, pH 8.0, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS. The lysates were centrifuged 10 min at 2000g at 4°C in complete proteinase inhibitor cocktail (Roche).After the protein extraction, western blot protocols were the same for both human skin samples and zebrafish. The supernatants were removed and the proteins were quantified using DC protein Assay (BIO-RAD) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. As23a primary antibody, rabbit antisera DE/1 directed against *Ap1s1* was used at a concentration of a 1:5000 (antibody obtained from Dr. Traub)<sup>75</sup>. Horse radish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:5000; Jackson Immuno research Laboratories Inc.) was used as a secondary antibody. Visualization was performed by using Western Lightning Chemi luminescence Reagent Plus (PerkinElmer). Hybridization of the same blot using anti-actin antibody was used to assess equal loading of the samples (mouse monoclonal anti-actin 1:5000, Chemicon # MAB1501).

#### 4.7.8 Immunohistochemistry

Briefly, all dechorionated larvae were collected, anesthetized in 0.2% MS-222 (sigma) and fixed for two hours in 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature as previously described<sup>37</sup>. Samples were then washed in phosphate buffered saline (PBS) before dehydration in 100% methanol and kept at -80°C for later use. For cytokeratin labeling, larvae were stored in Dent's fixative at -20°C. Primary and secondary antibody incubations were conducted overnight at 4°C in blocking solution. Then samples were washed in PBS-Tween and incubated overnight with Alexa 488 (anti-rabbit) or 568 (antimouse) antibodies (Molecular Probes). After four



washouts in PBS-tween, larvae were mounted on slides in glycerol 90%, for immunofluorescence imaging. Primary antibodies were used at the following dilutions: rabbit antisera DE/1 directed against *Ap1s1* 1:200; monoclonal mouse anti-acetylated tubulin (Sigma) 1:1000; monoclonal mouse anti-HB91:200 (Developmental Studies Hybridoma Bank 81.5C10); polyclonal rabbit anti-Pax2 1:100 (Covance PRB-276P); polyclonal rabbit anti-phosphohistone H3 (Ser10), Upstate06 570) 1:100; monoclonal mouse anti-HU (Molecular Probes A21271) 1:100; Laminin24(anti-laminin, Sigma 1: 100; Cadherin (anti-pan-cadherin, Sigma) 1: 400; p63: (SantaCruz) 1:100; Cytokeratin (mouse monoclonal anti cytokeratin type II KS Pan 1-8 (ProgenBiotechnik) 1:10. To verify for cell death in wholemount larva, we stained them using the vital dye Acridine Orange, as described previously<sup>76</sup>.

#### 4.7.9 Imaging

The fluorescent images represent the maximum projection of a series of 2 $\mu$ m optical sections obtained in whole mount larva using a laser confocal microscope (Perkin Elmer Ultraview system mounted on a LEICA DM LFSA microscope with a 63X oil objective 1.25 NA) and Metamorph software (Universal imaging Corp). Antibody-labeled cells (HU, BH9, PAX2 and PH3) were counted in equal length spinal cord segments (75 $\mu$ m) imaged at the 14th somite and cover the entire spinal cord volume. Statistical significance between *Ap1s1* KD and WT larva groups was verified using Mann-Whitney rank sumtest (Sigmastat). Transmitted light images were digitized using a digital camera (AxioCam HRC, Zeiss) mounted on a dissecting microscope (Stem1 SV 11, Zeiss) and Axiovision 4.2 software. To document the response to touch of the 48hpf larva high speed video films were digitized (250 frames/sec) using a Photron Fastcam PCI high speed video camera mounted on a Zeiss dissection microscope. The captured films were analyzed off line to determine swim frequency. Representative images from these films were used to reconstruct the movements of *Ap1s1* KD and WT larvae in Fig. 9, page 41 A, F.

#### 4.8 Figure legends

**Figure 6. Identification and characterization of a splice mutation in *AP1S1*.**

Pedigree of the fourth MEDNIK family from the Kamouraska region. B) Sequence chromatograms of the intron 2/exon 3 junction of *AP1S1* in a normal control (N), a carrier (C) and an affected individual (A) from family EKV3-02. The filled arrow indicates the mutation (A to G) and the dotted arrow points the cryptic splice site. C) Expression of the *AP1S1* isoforms. Relative expression levels of each mRNA species (scaled to 100% of control values on the y-axis) are shown for normal controls (N; n=2) carriers (C; n=6) and affected individuals (A; n=3). Values were averaged from three independent experiments. 18S RNA was used to normalize the mRNA quantity. The expression levels from this latter mRNA species could not be distinguished from the wild-type in the carriers in this figure. The expression levels are indicated as percentage of the control values Inset: RT-PCR showing the different species observed. The upper band (166 bp) contains the full-length species in both the control (N) and the carrier (C), whereas the lower band (57 bp) corresponds to the species lacking exon 3. A third mRNA species lacking 9bp, generated by the use of a cryptic splice site, was confirmed by sequencing the upper band (157 bp) of the affected individual (A). D) Schematic representation of the Human *AP1S1* gene. The A >G mutation in the acceptor splice site of exon 3 predicts skipping of this exon, leading to a premature stop codon. The use of an alternative acceptor splice site within exon 3 results in a mRNA lacking 9 bps coding for an in frame protein. The location of the two different morpholinos used to knockdown *Ap1s1* in zebrafish, targeting either ATG or exon 3 acceptor splice site, are shown in green.

**Figure 7. Morphological phenotype of *Ap1s1* knockdown zebrafish is rescued by over expression of human *AP1S1*.**

Transmitted light images of 48 hpf *Ap1s1* KD larvae show their smaller size, reduced pigmentation (D) and skin disorganization (E) compared to the WT (A,B) and the rescued larvae (G,H). Immunofluorescence of wholemount zebrafish using anti-*Ap1s1* antibody showing localization of *Ap1s1* to the plasma membrane (C, polygonal) and to a well defined perinuclear ring, in both normal (C) and rescued larvae (I), where as only a residual and diffuse staining could be observed in KD larvae (F). Western blot analysis (D, inset) indicates nearly complete knockdown of

*Ap1s1* protein (WT = wild type, KD = knockdown, CTRL = control rat brain proteins). To normalize the western blot analysis, proteins extracted from WT, KD and CTRL larvae were incubated with anti-actin. Scale bars in (A, D, G) =100  $\mu$ m, (B,E,H)= 50  $\mu$ m.

**Figure 8. *Ap1s1* knockdown is associated with abnormal distribution of laminin and cadherin**

Despite changes in the size and shape of the tail, p63-labelled nuclei (orange) of basal keratinocytes were present in KD larvae (B). The insets show enlarged views of small groups of keratinocytes. Immunolabelling for laminin (green) in WT (C) showed normal distribution of the basement membrane along the fin fold margin, whereas in the KD larvae the residual laminin labeling was diffuse and disorganized (D). Compared to WT keratinocytes (E) labeled with p63 (orange), cadherin (green) is decreased at the cell membrane of the KD larvae (F). However, the localization of cytokeratin in WT (G) and in KD larvae (H) appeared similar. Scale bars: A-B 10 $\mu$ m, Insets in A, E, G= 20 $\mu$ m.

**Figure 9. Abnormal behavioral phenotype and impaired development of spinal neural network of *Ap1s1* knockdown zebrafish.**

Consecutive images from films illustrating the response to touch in 48 hpf wild type (WT) (A) and *Ap1s1* KD larvae (F). The WT larva reacted to touch by swimming away. In contrast, the *Ap1s1* KD larvae exhibit slow and impaired reaction. Immunostaining in wholemount 48 hpf WT (B-E) and *Ap1s1* KD larvae (G-J) illustrating the reduced axonal labeling (anti-acetylated tubulin; B and G red, the arrows point to the ventral roots), the reduced number of newly born cells (anti-HU antibody; red in C and H), and the number of interneurons (anti-Pax2 antibody; E and J green) in the *Ap1s1* KD larvae. In turn, the number of motoneurons (anti-HB9 antibody; D and I, red) was similar both in WT and *Ap1s1* KD. Scale bars: 25 $\mu$ m

**Supplementary table 1**

Clinical features of affected individuals with MEDNIK. EKV: erythrokeratoderma variabilis; VLCFA: very long chain fatty acids; NA: not available; mo: month.

### Supplementary figure 1

A) Typical erythrokeratoderma variabilis skin lesion. B) The histological analysis revealed an epidermal hyperplasia accompanied by compact hyperkeratosis (CH) and hypergranulosis (HG). C) Normalized western blot analysis of skin proteins indicates faint expression of *Ap1s1* in affected individuals (A), probably because of partial expression of the isoform lacking three amino acids, compared to mutation carriers KEKV-02-04 (C) and control (Ctrl). Proteins were extracted from biopsies obtained from both lesional and non-lesional (\*) skin in individual KEKV-01-03.

### Supplementary Figure 2

Representative transmitted light images of 48 hours-old zebrafish larvae illustrating the phenotype under different experimental conditions. **A.** Wild type (WT), non injected larvae **B.** Knockdown larva, injected with AMO targeting the translation start site of *Ap1s1* (N-terminal). **C.** Larva rescued by co-injection of AMO and human WT mRNA (HmRNA). **D.** Larva injected with a mismatch AMO. **E.** Larva rescued by co-injection of AMO and -9bp Human mRNA. **F.** Larva co-injected with AMO and -exon3 HmRNA. **G.** Knockdown larva, injected with AMO targeting the acceptor splice site (intron 2) of *Ap1s1*.

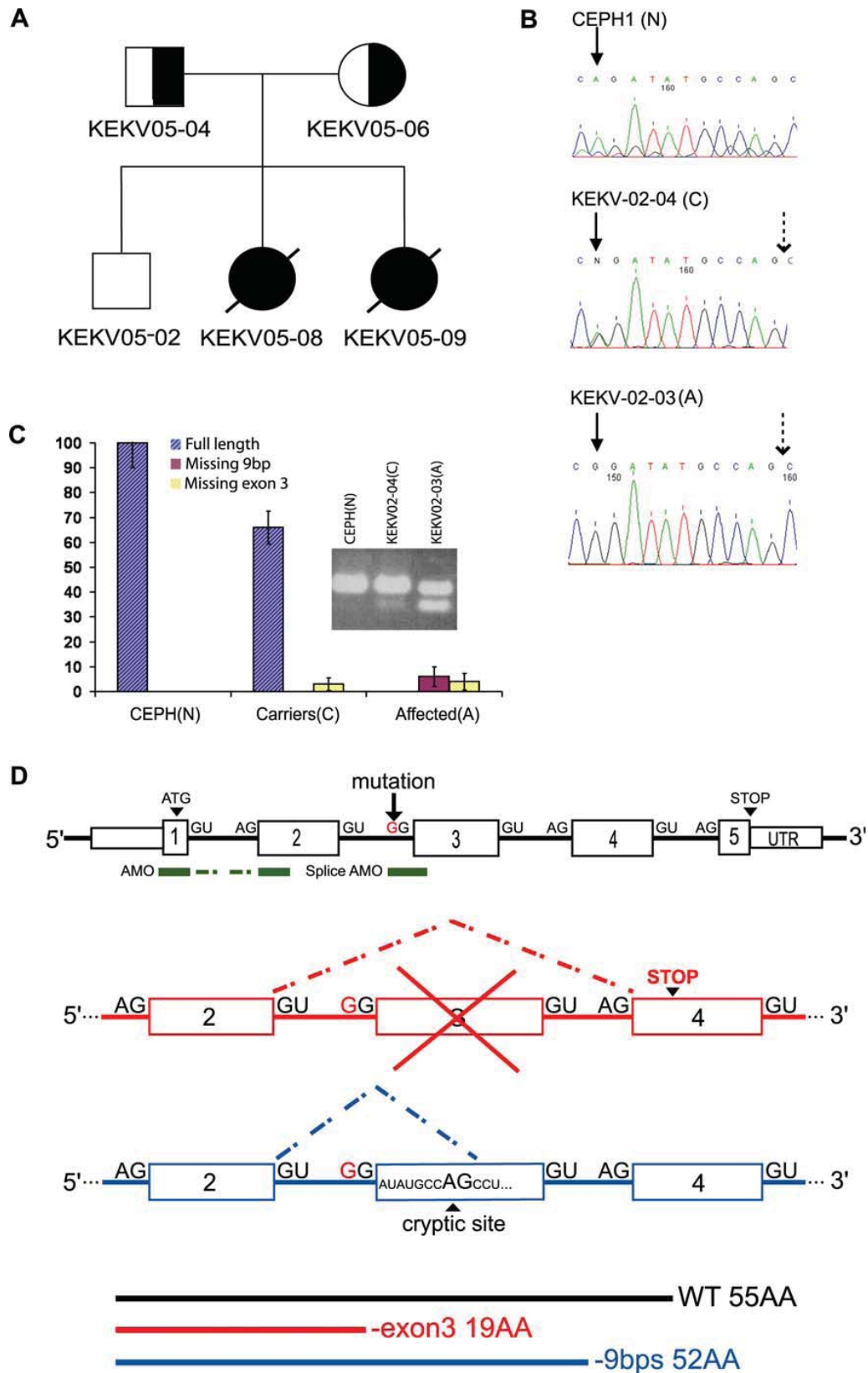
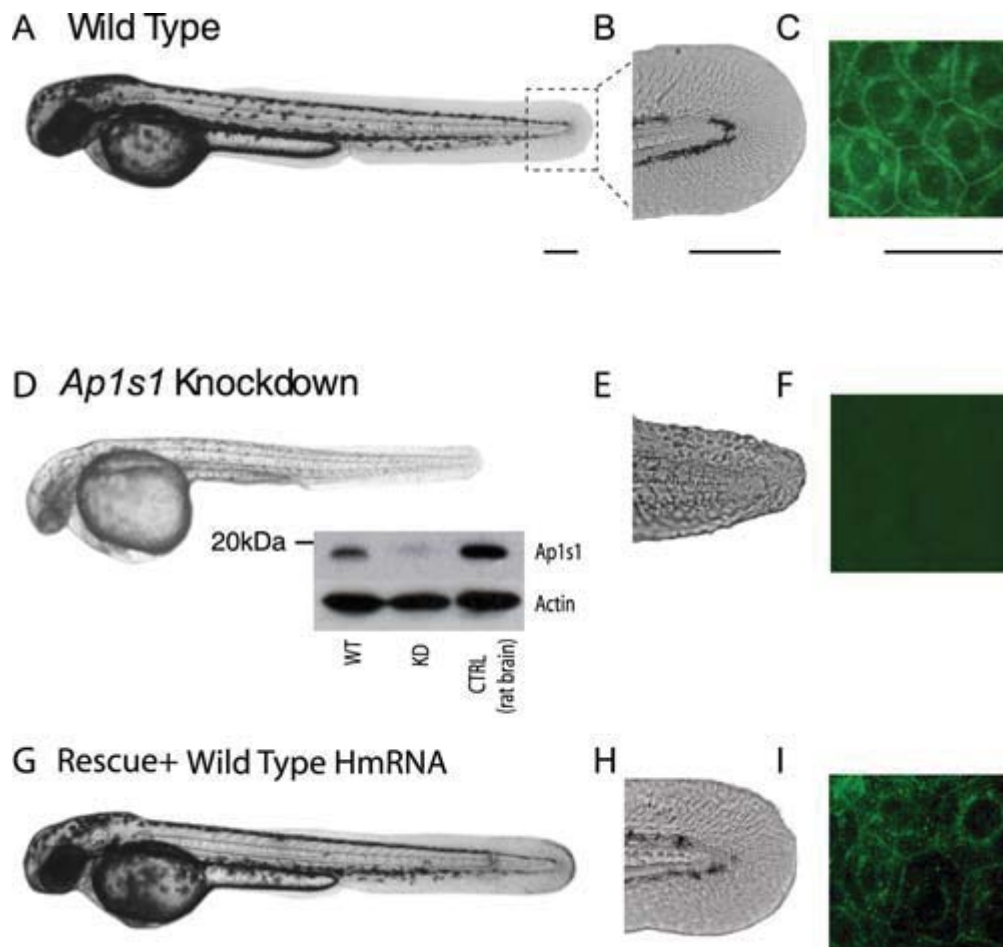
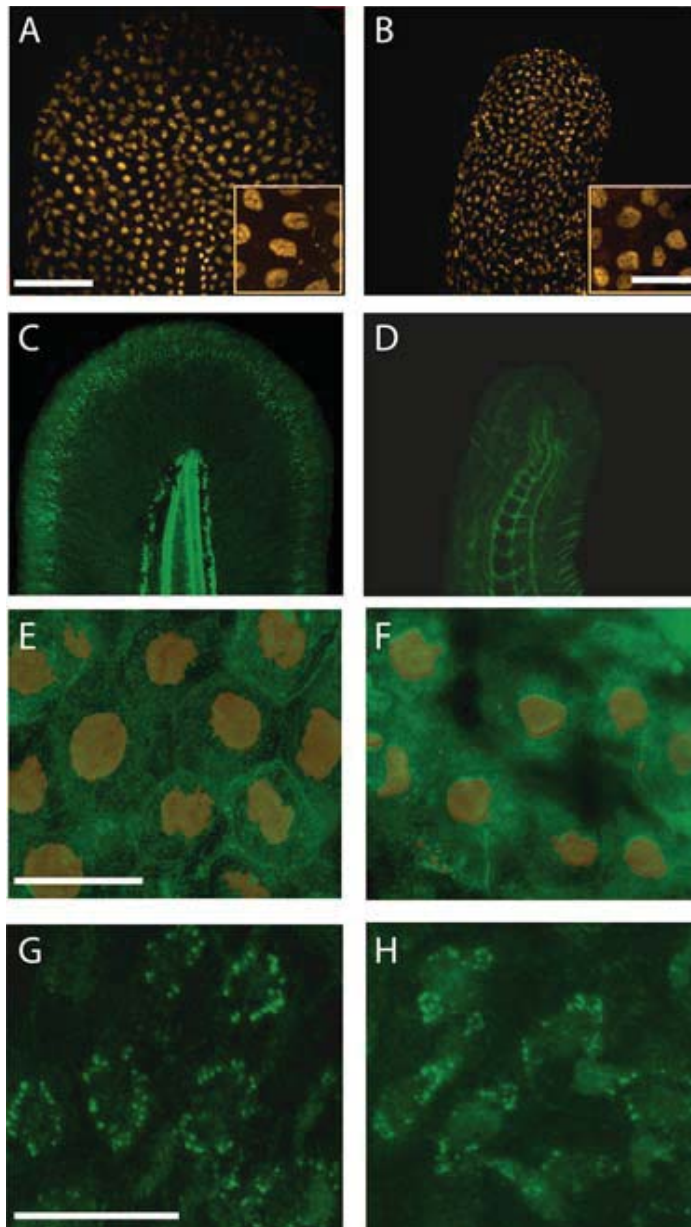


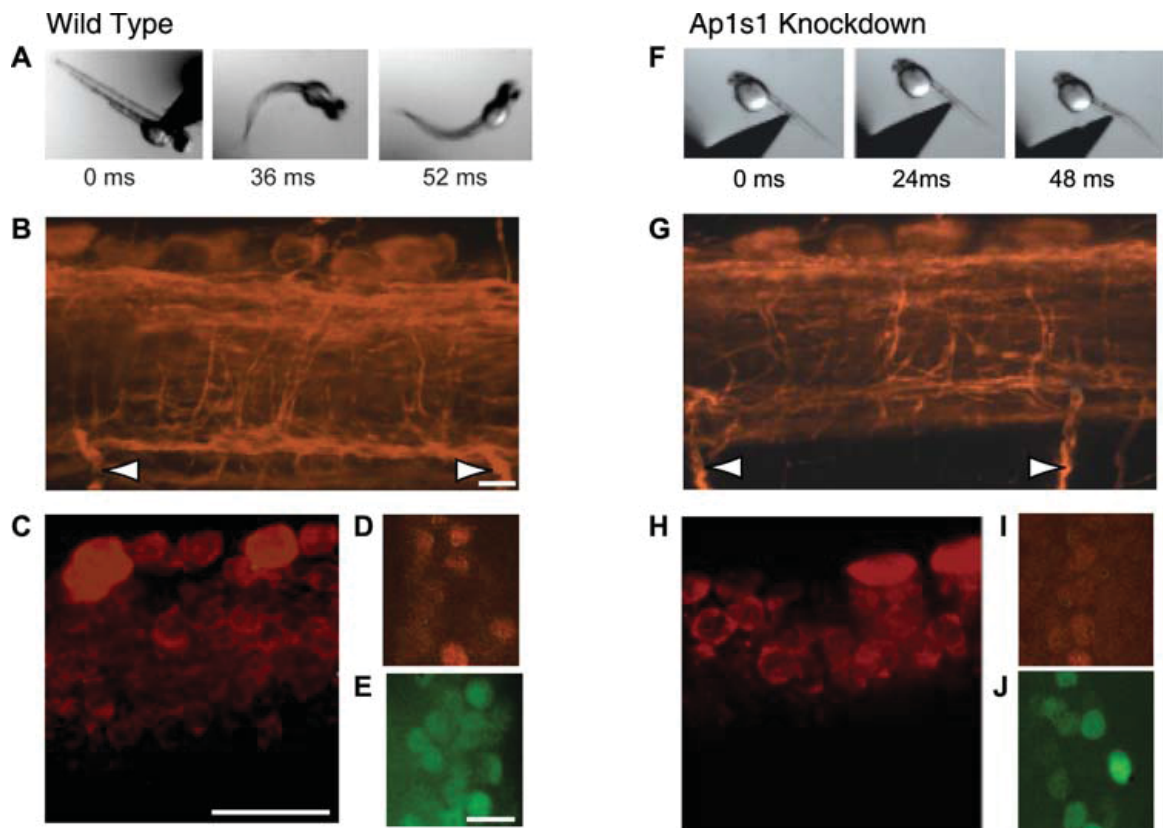
Figure 6. Identification and characterization of a splice mutation in *APIS1*.



**Figure 7. Morphological phenotype of *Ap1s1* knockdown zebrafish is rescued by over expression of human AP1S1.**

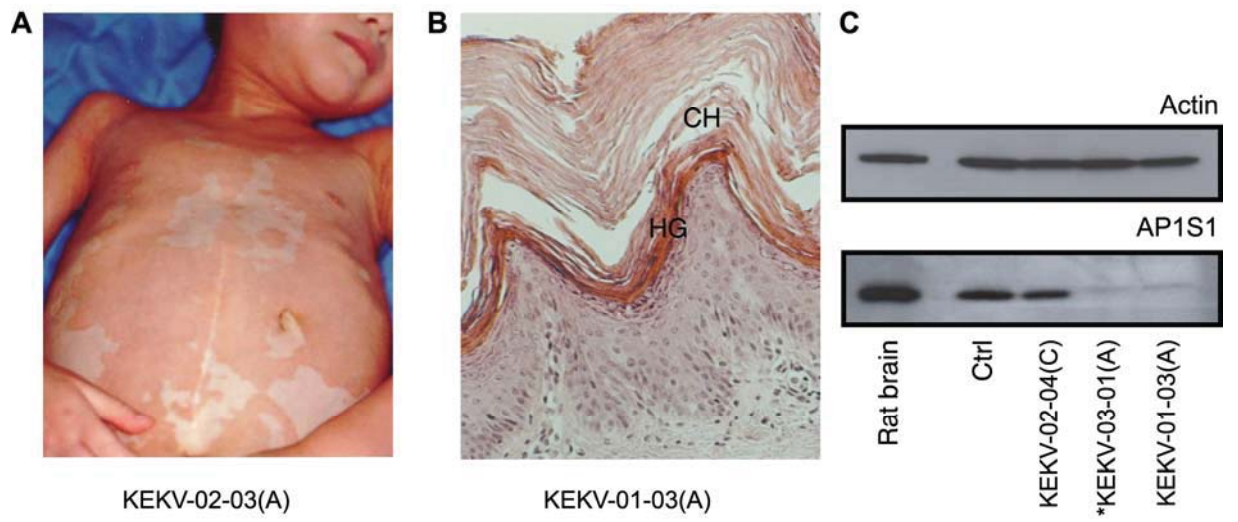


**Figure 8. *Ap1s1* knockdown is associated with abnormal distribution of laminin and cadherin**

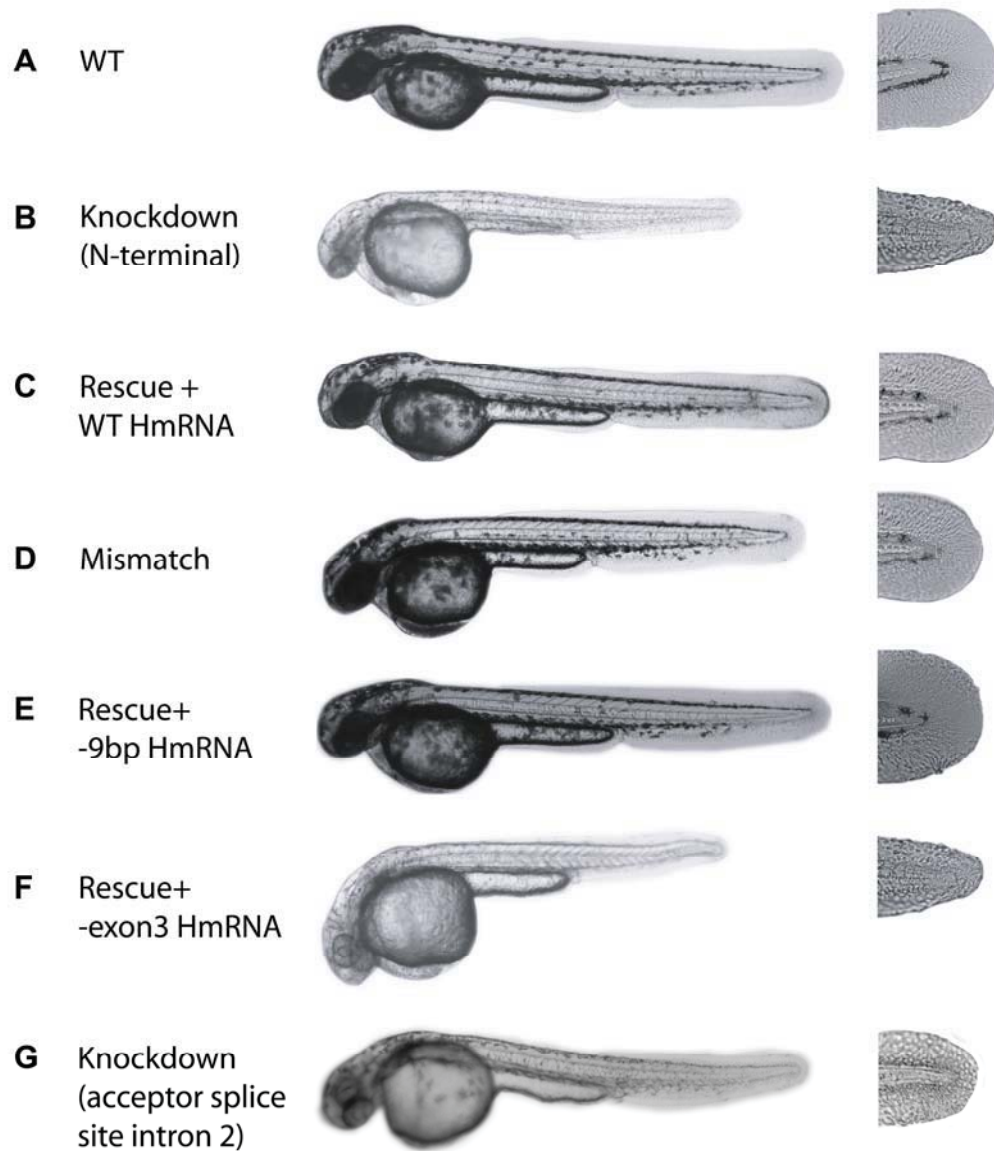


**Figure 9. Abnormal behavioral phenotype and impaired development of spinal neural network of Ap1s1 knockdown zebrafish**





**Supplementary Figure 1. Typical erythrokeratoderma variabilis skin lesion.**



**Supplementary figure 2. Representative transmitted light images of 48 hours old zebrafish larvae illustrating the phenotype under different experimental conditions.**

Individual	Facial appearance	Cutaneous manifestations	Neurological manifestations	Gastro-intestinal manifestations	VLCFA	Other
KEKV02-03	triangular, high forehead	EKV ichthyosiform erythrodermia	Psychomotor retardation, hypotonia, peripheral neuropathy, sensorineural deafness	congenital diarrhea	↑C24+ ↑C26+ +	cataracts
KEKV02-05	NA	NA	NA	congenital diarrhea, hepatic fibrosis, cholestasis	NA	Cataracts, death (7 mo)
KEKV01-03	mongoloid, high forehead	EKV ichthyosiform erythrodermia	Psychomotor retardation, hypotonia, peripheral neuropathy, sensorineural deafness	congenital diarrhea	↑C24+ ↑C26+ +	
KEKV01-04	NA	NA	NA	congenital diarrhea icterus	NA	death (16 days)
KEKV03-03	mongoloid, high forehead	EKV ichthyosiform erythrodermia	Psychomotor retardation, hypotonia, peripheral neuropathy, Sensorineural deafness	congenital diarrhea, intestinal volvulus	↑C24+ ↑C26+ +	nephro - calcinosis
KEKV04-03	mongoloid, high forehead	ichthyosis	Psychomotor retardation, sensorineural deafness	congenital diarrhea, cholestasis, cirrhosis, microcolon	NA	death (16 mo)
KEKV05-08	NA	ichthyosis	hypotonia, sensorineural deafness	congenital diarrhea, cholestasis, cirrhosis, jejunal atresia	↑C24+ ↑C26+ +	death (18 mo)
KEKV05-09	NA	ichthyosis	NA	congenital diarrhea, cholestasis, icterus		death (2 mo)

**Supplementary table 1 Clinical features of affected individuals with MEDNIK.**

## Chapitre 2 Discussion et conclusion

---

### 1. Discussion

Cette étude a permis l'identification d'une nouvelle mutation fondatrice dans le gène *AP1S1* responsable du syndrome neurocutané MEDNIK. Ce syndrome rare, exclusif à la région de Kamouraska dans le Bas-St-Laurent de la province de Québec, est lourdement handicapant et est transmis selon un mode autosomique récessif. Les patients homozygotes pour cette mutation présentent un retard mental important, des diarrhées congénitales sévères pouvant entraîner la mort en très bas âge, une surdité neurosensorielle, une neuropathie périphérique, de l'ichtyose et une kératodermie <sup>8</sup>.

C'est l'étude de la perte de fonction de la sous-unité  $\sigma 1$  de l'AP1 chez le poisson zébré qui a permis de démontrer l'effet pathogène de cette mutation. La caractérisation biologique de notre modèle animal a montré l'implication de  $\sigma 1$  dans le développement des cellules épithéliales *in vivo*. Le phénotype associé à la perte de fonction de la sous-unité  $\sigma 1$  dans notre modèle animal suggère que cette protéine est impliquée dans la différenciation de la population d'interneurones de la moelle épinière.

Mon apport à cette étude se limitant au développement du modèle animal, la discussion portera essentiellement sur la caractérisation fonctionnelle de la mutation du *AP1S1*

#### 1.1 Développement du modèle animal pour l'étude du gène AP1S1

Les complexes adaptateurs de clathrine jouent un rôle primordial dans le transport des protéines. Ces complexes régulent la formation de vésicules de transport qui régissent le trafic cellulaire entre l'appareil de golgi-trans et les endosomes, les lysosomes ainsi que la membrane plasmique. Le développement de modèles animaux où certaines composantes de ce complexe ont été inactivées peut permettre de mieux comprendre le rôle de ces molécules. En particulier, l'inactivation de

molécules qui composent le complexe protéique AP-2<sup>77, 78, 79, 80</sup> et AP-3<sup>81, 62</sup> a permis de développer des modèles animaux viables afin d'étudier *in vivo* le rôle de ces adaptateurs de clathrine.

### 1.1.1 Les mutants pour AP-2

Les mécanismes moléculaires de la fonction de AP-2 ont été largement documentés. Ce complexe joue un rôle d'interface dans le processus d'endocytose permettant l'internalisation de portions de membranes plasmiques ainsi que de composantes protéiques. Ce complexe contrôle la polymérisation des clathrines et sélectionne les protéines à internaliser. Des études de dominant négatif et d'interférence à l'ARN ont démontré que AP-2 était nécessaire à l'internalisation de récepteurs qui circulent via la membrane plasmique<sup>82, 83, 84, 85</sup>. Ces différentes études n'ont pas montré la perte de viabilité des cellules en l'absence de l'AP-2. Cependant, dans les cellules traitées avec l'ARN interférence, on a pu déceler une présence résiduelle de AP-2. De plus, les études *in vivo* chez *C.elegans* et *D melanogaster*<sup>77,78,79</sup> ont démontré que la fonction de l'AP-2 était nécessaire pour le développement embryonnaire. Ces résultats ont été confirmés chez la souris où la sous-unité  $\mu 2$  du complexe AP-2 a été inactivée : alors que la souris mutante hétérozygote montre un phénotype normal, l'état homozygote est létal à moins de 3,5 jours après la fécondation<sup>83</sup>.

### 1.1.2 Des mutations dans AP-3 causent le syndrome d'Hermansky-Pudlak

Le syndrome humain d'Hermansky-Pudlak (HPS) est un syndrome rare transmis selon un mode autosomique récessif. Ce syndrome est caractérisé par un albinisme occulo-cutané et des hémorragies causées par des mutations identifiées au sein du gène *AP3B1*, qui code pour la grande sous-unité  $\beta 3A$  de l'AP-3A<sup>86, 43</sup>. Ces mutations seraient associées à un défaut de transport cellulaire au niveau des lysosomes, des mélanosomes et des granules denses des plaquettes<sup>43</sup>.

La souris est un modèle expérimental largement utilisé comme modèle pour HPS et au moins 16 mutants impliquant différentes sous-unités du complexe AP-3 ont recensés dans cette espèce. En particulier, deux souris mutantes (*pearl* et *mocha*) présentent des symptômes cliniques similaires à ceux des patients atteints de HPS2

avec notamment une hypopigmentation et des saignements prolongés. Ce phénotype est causé par des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités  $\beta 3A$  (*pearl*) et  $\gamma 3A$  (*mocha*) de l'AP3<sup>81, 62</sup>. Comme l'AP-1, l'AP-3A possède un isoforme ubiquitaire (AP-3A) et un isoforme spécifique aux cellules neuronales (AP-3B). La sous-unité  $\delta$  de l'AP3 se retrouve dans les deux isoformes, ce qui explique les troubles neurologiques décrits chez la souris mutante *mocha*. Cette dernière présente notamment des troubles de l'oreille interne tels des pertes de l'équilibre et de l'audition<sup>62</sup>.

### 1.1.3 Les mutants pour AP-1

Peu d'études ont été menées précédemment sur la sous-unité  $\sigma 1$ . Il a été suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle de stabilisation au sein du complexe hétérotétramérique dans lequel elle se trouve.<sup>34</sup> De plus, dans les complexes AP-1 et AP-3, cette sous-unité aurait un rôle à jouer dans la sélection des protéines à être transportées<sup>29, 56, 33</sup>. Puisque l'inactivation des sous-unités de l'AP-1 dans différents modèles animaux est létale à l'étape embryonnaire, on peut imputer à ces sous-unités des fonctions cruciales dans le développement de l'organisme.

Par exemple, l'inactivation chez la souris (KO) des gènes codant pour les sous-unités  $\gamma 1$ <sup>87</sup> et  $\mu 1$ <sup>88</sup> est létale à différents stades embryonnaires. La souris KO pour la sous-unité  $\gamma 1$  meurt avant 4,5 (E4.5) jours après la fécondation. À 2,5 jours, la traduction des ARNm maternels commence à diminuer, tandis que la traduction zygotique s'amorce. Il semblerait qu'il y ait un seuil de traduction minimum requis pour le développement de la souris  $\gamma 1$ -KO. Cette étude a montré que la sous-unité  $\gamma 1$  de l'AP-1 est essentielle à la viabilité cellulaire et que la fonction de AP-1 serait impliquée dans un système multicellulaire complexe qui permet le développement de l'embryon après les stades de nidation et du blastocyste. De plus, même si la sous-unité  $\gamma 2$  de l'AP-2 partage 60% d'identité avec  $\gamma 1$ , cette sous-unité ne peut compenser la perte de  $\gamma 1$ .

La souris KO pour la sous-unité  $\mu 1A$  se développe jusqu'à 13,5 jours après la fécondation. Ces résultats laissent suggérer que la sous-unité  $\mu 1B$  peut compenser pour la perte de l'isoforme  $\mu 1A$ . Il est noté que, jusqu'à E16, l'embryon est

majoritairement constitué de cellules épithéliales et que l'isoforme AP-1B est spécifique à ces cellules. C'est à partir de l'organogenèse que le développement de la souris déficiente pour la sous-unité  $\mu 1A$  est perturbé. L'absence de sous-unité  $\mu 1A$  affecte le développement du cœur, du cerveau et du foie et entraîne des malformations et des dysfonctionnements qui conduisent à la morbidité. Chez cet embryon, la localisation des protéines membranaires semble partiellement compensée par la sous-unité  $\mu 1B$ , tandis que la culture cellulaire de fibroblastes dérivés de ces embryons montre que les récepteurs 6 mannose phosphate et les furines sont confinés aux endosomes. Un apport exogène de  $\mu 1B$  dans ces fibroblastes permet donc la localisation adéquate des récepteurs mannose-6-phosphate transportés (MPR) tandis que les furines demeurent dans les endosomes<sup>89</sup>.

Enfin, l'inactivation des quatre sous-unités de l'AP-1 ont été testées chez le nématode *C.elegans*<sup>78</sup> et tous ces mutants étaient létaux à des stades embryonnaires, incluant la sous-unité  $\sigma$ .

Un des apports importants de notre étude a donc été de développer le premier modèle animal viable suite à l'inactivation d'une sous-unité constituant l'AP-1. La transcription de la sous-unité  $\sigma 1$ , dont les fonctions biologiques ont été très peu étudiées, a été inhibée dans le poisson zèbre par l'injection d'une séquence d'oligonucléotides anti-sens visant à bloquer la traduction de l'AP1S1 (KD) (Fig. 7 D, page. 39). Deux éléments pourraient expliquer la viabilité de notre modèle :

1. l'inactivation partielle de la traduction de l'AP1S1, tel que suggéré par un léger marquage anti-AP1S1 résiduel en immunohistochimie ;
2. une compensation par différentes sous-unités  $\sigma$ , dont l'expression serait plus facilement modulée chez le poisson zébré que dans d'autres organismes

#### 1.1.4 Rôle du complexe AP-1 dans le développement de l'épiderme, du transport et de la polarité cellulaire

À 48 heures après fertilisation, la larve KD pour le gène *AP1S1* montre un important déficit dans l'organisation des cellules épithéliales. Le marquage immunohistochimique utilisant l'anti-p63 un marqueur pour les noyaux des kératinocytes basaux est normal dans ces cellules, ce qui suggère que le patron de différenciation précoce de l'épiderme n'est pas perturbé.

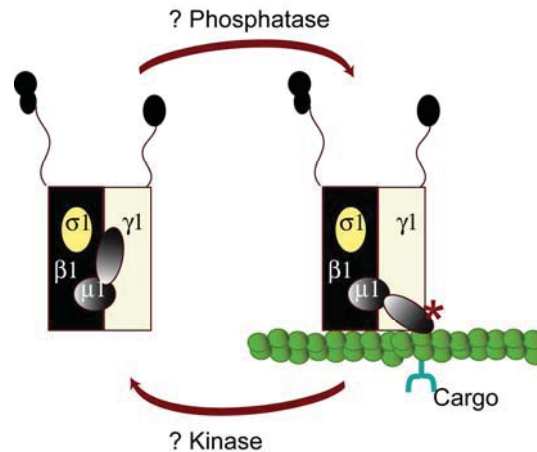
Durant le développement embryonnaire, les cellules épithéliales polarisent leur membrane plasmique en deux domaines distincts : apical et basolatéral. Une fois cette polarité établie, il est important qu'elle soit maintenue afin de préserver l'intégrité cellulaire. Celle-ci est assurée par la barrière que forment les jonctions serrées situées entre les deux domaines. Elle empêche notamment la diffusion des molécules du domaine apical vers le domaine basolatéral et vice versa. De plus, la localisation adéquate des protéines transmembranaires joue un rôle très important dans la préservation de l'intégrité des domaines apical et basolatéral<sup>90</sup>. La première étape dans ce processus de localisation spécifique consiste en la reconnaissance d'un déterminant de triage situé dans la queue cytoplasmique de la protéine transmembranaire tel qu'un motif dileucine ou tyrosine<sup>56,91</sup>. Les cellules épithéliales sont hautement polarisées et contiennent les deux isoformes de l'AP-1 (AP-1A qui est ubiquitaire et AP-1B qui leur est exclusif). Bien que ces deux protéines adaptatrices partagent une grande homologie de séquence, leurs fonctions et leurs localisations demeurent bien distinctes.

#### 1.2 AP1-A versus AP1-B : différences et similarités

Le recrutement de l'AP-1A au réseau trans Golgi (TGN) est tributaire de la liaison de la sous-unité  $\mu 1$ <sup>35</sup> avec le phosphatidylinositol4-Phosphate (PtdIns4P)<sup>92</sup>. Le changement de conformation de la sous-unité  $\mu 1$  durant le recrutement à la membrane permettrait la liaison à la protéine cargo, le récepteur mannose-6-phosphate<sup>93</sup>. Un état phosphorylé de  $\mu 1$  permettrait ce changement de conformation, puisque la phosphorylation prédit un changement de conformation avec allongement de la sous-unité à l'extérieur du complexe AP-1<sup>93</sup> (Fig. 10, page 50) Après la



formation de la vésicule,  $\mu 1$  serait déphosphorylée afin de faciliter la fusion de la vésicule avec la membrane cible. Les sites de phosphorylation étant conservés dans les deux protéines  $\mu 1A$  et  $\mu 1B$ , un mécanisme similaire est proposé pour les complexes AP-1A et AP-1B <sup>93</sup>.



**Figure 10. La phosphorylation de l'AP1**

Les complexes ubiquitaires AP-1A et AP-1B sont identiques pour ce qui est des sous-unités  $\gamma 1$ ,  $\beta 1$  et  $\sigma 1$ , alors qu'ils partagent 80% d'homologie pour les sous-unités  $\mu 1A$  et  $\mu 1B$  <sup>94</sup>. Malgré cette homologie de séquence, l'AP-1A et l'AP-1B forment des vésicules de transport différentes et possèdent des fonctions distinctes <sup>72</sup>. Le rôle de l'AP-1B a été élucidé notamment par des études réalisées avec la lignée cellulaire LLC-PK1. Dans ces cellules, les protéines basolatérales contenant une séquence signal avec des résidus tyrosine (e.g. *lipoprotéines à faible densité* (LDL), récepteurs pour la transferrine) interagissent normalement avec l'adaptateur AP-1B. Dans cette lignée cellulaire, ces protéines étaient localisées au niveau du pôle apical plutôt qu'au domaine basolatéral de la cellule. Ce transport anormal a été corrigé par l'apport exogène de la sous-unité  $\mu 1B$  <sup>95</sup>. Bien que l'importance de l'AP-1B dans le triage basolatéral ait été démontré, cet adaptateur ne serait qu'une des composantes nécessaires au transport et à la localisation des protéines au pôle basolatéral de la cellule. Par exemple, les récepteurs FcII-B2 sont transportés correctement au domaine basolatéral en absence de l'AP-1B <sup>96</sup>. Enfin, le KD de la sous-unité  $\mu 4$  de l'AP-4 dans des cellules *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) entraîne des défauts de transport du récepteur LDL <sup>97</sup>.

En ce qui concerne sous-unité  $\mu 1$ , la région carboxy-terminale de la protéine contient la séquence consensus pour la reconnaissance du signal leucine EXXXLL. Cependant, des études montrent que la séquence Asp-GluXXXLeu (Leu-Ile) est plutôt liée via l'hémicomplexe  $\gamma 1$ - $\sigma 1$ <sup>56</sup>. De plus, les sous-unités  $\gamma$  et  $\sigma$  du complexe AP-1 joueraient un rôle de stabilisation du complexe tétramère<sup>29</sup>. Considérant ces données, il est plausible que l'inactivation de la sous-unité  $\sigma 1$  entraîne des perturbations dans le développement des cellules épithéliales *in vivo*. Tel que démontré au chapitre 1 (Fig. 7 E, page 39), l'inactivation de la sous-unité  $\sigma 1$  chez le poisson zèbre en développement est associée à une mauvaise localisation d'au moins de deux composantes essentielles des kératinocytes, soit la laminine et la cadhérine, vraisemblablement par une perturbation du fonctionnement des complexes de l'AP-1A et AP-1B. Aussi, contrairement au patron d'organisation polygonal des cellules épithéliales, la larve KD présente des cellules rondes et désorganisées ce qui suggère un rôle important du complexe AP-1 dans l'établissement de la polarité cellulaire. En somme, basé sur nos observations chez le poisson zèbre et tenant compte des études préalables de la littérature, il est vraisemblable que la perturbation du complexe AP-1 mène à un défaut de transport de certaines protéines par les endosomes, notamment la laminine et la cadhérine, qui ne sont plus localisées correctement dans les différents compartiments cellulaires. De façon consistante avec ces observations, Bryant *et al.* (2004)<sup>48</sup> suggèrent que AP-1 est un candidat dans la reconnaissance du signal di-leucine contenu dans la queue cytoplasmique de la cadhérine.<sup>65</sup>

### 1.3 Pigmentation

On peut présumer que la diminution de la pigmentation, autant dans les yeux que sur le corps de la larve KD pour AP1S1, s'explique également par l'inactivation du complexe AP-1. En effet, les complexes AP-1 et AP-3 sont impliqués dans le transport polarisé des composantes des mélanosomes, par un processus redondant qui permet des routes alternatives pour une distribution polarisée de protéines, telles que l'adressage de la tyrosinase des endosomes vers les mélanosomes<sup>99</sup>. L'AP-1A est notamment impliqué dans le transport d'une composante structurale essentielle aux mélanosomes, Pmel17, à partir du TGN vers les mélanosomes<sup>74, 100</sup>. Or, dans les mélanocytes transfectés avec l'AP-1, la protéine Pmel17, spécifique aux endosomes, est transportée indirectement via la membrane plasmique vers les mélanosomes par

AP-1B. La diminution de la pigmentation dans la larve KD pour AP1S1 (Fig.7 D, page 39) laisse donc suggérer que l'AP-1 est essentiel à la pigmentation chez le poisson zébré et que la compensation par les autres complexes AP tel que l'AP-3 dans ce modèle n'est pas suffisante.

#### **1.4 Rôle de la protéine AP1S1 dans le développement normal du système nerveux**

Le KD de AP1S1 chez la larve du poisson zèbre est associée à une perturbation importante des fonctions motrices (Fig. 9 A, F, page 41). En investiguant les différentes composantes du réseau neuronal de la moelle épinière, nous avons observé que le nombre de prolongements axonaux et de cellules nerveuses progénitrices est diminué chez les morphants. De façon intéressante, il y a 46% moins d'interneurones chez la larve KD que dans les larves sauvages, alors que la population des neurones moteurs demeure inchangée (Fig. 9 E, J, page 41). Ces observations sont compatibles avec les données de la littérature qui suggèrent que les complexes AP jouent un rôle important dans le fonctionnement neuronal. Selon les résultats obtenus par l'étude de Nakatsu Fet al. (2004) <sup>61</sup>, le complexe AP-3 est impliqué dans la formation et la fonction des vésicules synaptiques GABAergiques <sup>61</sup>. Cette implication serait responsable de la propension de leurs souris KO à faire des crises d'épilepsie suite à l'inactivation de la sous-unité  $\mu$ 3B. Tel que mentionné ci-haut (Chapitre 2 section 1.1.2 page 46), la souris *mocha* <sup>62</sup>, qui résulte de l'inactivation de la sous-unité  $\delta$ 3A, présente des problèmes neurologiques avec perte d'audition et de l'équilibre. Enfin, la perte de l'AP-3 serait également associée à une perturbation de la libération des neurotransmetteurs <sup>63</sup>.

Les protéines motrices de la super famille des kinésines (KIFs ; kinesin super family proteins) participent également au transport des protéines <sup>70</sup>. Les protéines membranaires sont modifiées après leur traduction dans l'appareil de golgi, puis triées et dirigées vers leur destination dans de petites vésicules de transport qui bourgeonnent du TGN et qui sont mobilisées via la machinerie constituée de microtubules. Il a été démontré que la sous-unité  $\beta$ 1 de l'AP-1 interagit avec la protéine motrice KIF13A <sup>69, 70</sup>. Tel que mentionné précédemment, une des fonctions présumées de l'AP-1 est de lier une protéine à transporter, par exemple le M6PR, par

le biais de la sous-unité  $\mu 1$ . La sous-unité  $\beta 1$  lie la protéine KIF13A, qui est liée à des microtubules. La protéine KIF13A est impliquée dans le transport des organelles, des vésicules synaptiques et des protéines qui doivent migrer du corps cellulaire vers les axones et dendrites<sup>69,70</sup>. Des modèles animaux pour des membres de cette famille de protéines, tels que KIF1A et KIF1B $\beta$ , montrent une réduction des vésicules synaptiques dans les synapses et présentent des dysfonctions au niveau des fonctions sensori-motrices<sup>71</sup>. Chez l'homme, la maladie neuronale Charcot-Marie-Tooth de type 2A, qui entraîne une neuropathie périphérique, est causée notamment par des mutations au sein du gène *KIF1B $\beta$* <sup>71</sup>.

Bien que l'on connaisse peu les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le rôle de l'AP-1 dans le développement du système nerveux central et potentiellement dans l'établissement de la polarité à l'intérieur des cellules neuronales, le modèle KD pour AP1S1 chez le poisson-zèbre montre des perturbations substantielles au niveau du développement de la moelle épinière.

## 2. Conclusion

Cette étude a permis l'identification d'une nouvelle mutation dans le complexe adaptateur 1 de la clathrine. La mutation fondatrice dans le gène *AP1S1* est responsable du syndrome neurocutané de MEDNIK et son effet pathogène a été démontré par l'inhibition de la traduction de cette protéine chez le poisson zébré. Le développement du premier modèle animal viable pour cette protéine a montré l'implication de l'AP-1 dans le développement des cellules épithéliales et du réseau des cellules nerveuses de la moelle épinière. Les similitudes entre le phénotype du poisson knock-down pour *AP1S1* et les manifestations cliniques des patients atteints du syndrome de MEDNIK nous laissent suggérer l'implication de cette protéine dans l'établissement du réseau neuronal au niveau du cerveau, de l'oreille interne et de la moelle épinière. En effet, les patients atteints présentent un retard mental important, de la surdité et une neuropathie périphérique. Également, plusieurs études *in vitro*<sup>95,72,98,99,74</sup>, décrivent l'implication de l'AP-1 dans le transport approprié des protéines d'un compartiment cellulaire à un autre. Ceci nous laisse suggérer qu'une perturbation de l'organisation de l'épithélium digestif ou de transport de différentes molécules à travers celui-ci pourrait être responsable des diarrhées chroniques, de l'élévation des VLCFA et du retard de croissance observés chez les patients atteints du syndrome de MEDNIK. Tel que suggéré par les études *in vitro* de l'AP-1<sup>95, 72, 98, 99, 74</sup>, les manifestations cliniques du syndrome MEDNIK, combinées à notre étude chez le poisson zébré, sont compatibles avec un rôle important du gène *AP1S1* dans le transport intracellulaire polarisé.

## DESCRIPTION DE MA CONTRIBUTION

Afin de réaliser la caractérisation fonctionnelle du gène AP1S1 mutant chez le poisson zébré, j'ai réalisé les expériences suivantes ;

- 1) Injections des œufs pour les knock-down, rescue et mismatch.
  
- 2) Description du phénotype comportemental des larves en enregistrant le patron de nage des larves sauvages (WT), knockdown (AMO), rescue et mismatch (MM), en réponse au toucher 48 heures après la fertilisation. Pour documenter cette réponse au toucher, j'ai enregistré des films (250 frames/sec) en utilisant une caméra vidéo *Photron Fastcam PCI high speed video* bonifiée d'un microscope à dissection. J'ai analysé les films pour déterminer de manière quantitative la fréquence natatoire.
  
- 3) Description du phénotype morphologique. J'ai photographié les larves WT, AMO, *rescue*, MM. En utilisant un appareil digital (AxioCam HRC, Zeiss) monté sur un microscope à dissection (Stem1 SV 11, Zeiss). J'ai utilisé le logiciel Axiovision 4.2 software pour le traitement informatique des images.
  - 3.1) Réalisation des analyses d'immunomarquage suivantes : ap1s1, acetylated tubuline, PAX2, PH3, BH9, HU, cytokeratin. J'ai réalisé les images de ces différents immunomarcages en utilisant un microscope confocal (LEICA DM LFSA monté sur le système Perkin Elmer Ultraview) et le logiciel Metamorph (Universal imaging cropping). Afin de vérifier la mort cellulaire, j'ai réalisé un marquage avec l'Acridine Orange
  
  - 3.2) Comptage des cellules nerveuses marquées par les anticorps suivants ap1s1, acetylated tubuline, PAX2, PH3, BH9, HU au niveau du somite 14 de la moelle épinière des larves WT et AMO.

4) Réalisation des analyses de Western Blot en utilisant les poissons zébrés et les biopsies de peau obtenues d'individus normaux, porteurs et de patients (avec et sans lésions).

5) Participation à la rédaction de l'article pour l'ensemble de la partie sur la caractérisation fonctionnelle.

6) Réalisation des images de l'article suivantes;

Figure 7. Morphological phenotype of Ap1s1 knockdown zebrafish is rescued by over expression of human AP1S1.

Figure 9. Abnormal behavioral phenotype and impaired development of spinal neural network of Ap1s1 knockdown zebrafish

Tableau supplémentaire 1 Typical erythrokeratoderma variabilis skin lesion  
Figure supplémentaire 1 Clinical features of affected individuals with MEDNIK.

Figure supplémentaire 2 Representative transmitted light images of 48 hours old zebrafish larvae illustrating the phenotype under different experimental conditions.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. Mendes da Costa S (1925). Erythro- et keratoderma variabilis in a mother and daughter. *Acta. Derm. Venereol. (Stockh.)* 6:255–61
2. Rappaport IP, Goldes JA, Goltz RW (1986). Erythrokeratoderma variabilis treated with isotretinoin: a clinical, histologic, and ultrastructural study. *Arch. Dermatol.* 122:441–445
3. Richard G (2003). Connexin gene pathology. *Clin. Exp. Dermatol.* 28:397–409
4. Hohl D (2000). Towards a better classification of erythrokeratodermias. *Br. J. Dermatol.* 143:1133–9
5. Richard G, Brown N, Smith LE, Terrinoni A, Melino G, MacKie R, Bale S, Uitto J (2000). The spectrum of mutations in erythrokeratodermias– novel and de novo mutations in GJB3. *Hum. Genet.* 106:321–9
6. Khoo B-P, Tay Y-K, Tan S-H. (2000). Generalized erythematous plaques: progressive symmetric erythrokeratoderma. *Arch. Dermatol.* 136:665- 70
7. Giroux JM, Barbeau A (1972). Erythrokeratoderma with ataxia. *Arch. Dermatol.* 106(2):183-8
8. Saba TG, Montpetit A, Verner A, Rioux P, Hudson TJ, Drouin R, Drouin CA (2005). An atypical form of erythrokeratoderma variabilis maps to chromosome 7q22. *Hum. Genet.* 116:167-171
9. Macari F, Landau M, Cousin P, Mevorah B, Brenner S, Pannizon R, Schorderet DF, Hohl D, Huber M. (2000). Mutation in the gene for connexin 30.3 in a family with erythrokeratoderma variabilis. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1296–301



10. Knipe RC, Flowers FP, Johnson FR, DeBusk FL, Ramos-Caro FA (1995). Erythrokeratoderma variabilis: case report and review of the literature. *Pediatr. Dermatol.* 12: 21–3
11. Van der Schroeff JG, Nijenhuis LE, Khan PM (1984). Genetic linkage between erythrokeratoderma variabilis and Rh locus. *Hum. Genet.*; 68: 165–8
12. Richard G, Lin J-P, Smith L (1997). Linkage studies in erythrokeratodermias: fine mapping, genetic heterogeneity and analysis of candidate genes. *J. Invest. Dermatol.* 109: 66–71
13. Terrinoni A, Leta A, Pedicelli C, Candi E, Ranalli M, Puddu P, Paradisi M, Angelo C, Baggetta G, Melino G (2004). A novel recessive connexin 31 (GJB3) mutation in a case of erythrokeratoderma variabilis. *J. Invest. Dermatol.* 122:837-9
14. Gottfried I, Landau M, Di Glaser FW-L, Ophir J, Mevorah B, Ben-Tal N, Kelsell DP, Avraham KB (2002). A mutation in GJB3 is associated with recessive erythrokeratoderma variabilis (EKV) and leads to defective trafficking of the connexin 31 protein. *Hum. Mol. Genet.* 11:1311–16
15. Richard G, Smith LE, Bailey RA, Itin P, Hohl D, Epstein EH Jr et al. (1998). Mutations in the human connexin gene GJB3 cause erythrokeratoderma variabilis. *Nat. Genet.* 20:366–9
16. Morley SM, White MI, Rogers M, Wasserman D, Ratajczak P, McLean WH et al. (2005). A new, recurrent mutation of GJB3 (Cx31) in erythrokeratoderma variabilis. *Br. J. Dermatol* 152:1143–8
17. Lai-Cheong JE, Arita J *Invest Dermatol.* 1K, McGrath JA (2007). Genetic diseases of junctions 27(12):2713-25
18. Bruzzone R, White TW & Paul DL (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 238:1-27

19. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 65:475-502
20. Meşe G, Richard G, White TW J (2007). *Invest Dermatol.* 127(11):2516-24. Review.
21. Gottron HA (1923). Congenital symmetrical progressive erythrokeratoderma. *Arch. Dermatol. Syph.* 7:416
22. Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Lam H, Iizuka H, Friedman RA, Christiano AM (1997). The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope. *Am. J. Hum. Genet.* 61:581–9
23. Ishida-Yamamoto A, Iizuka H (1998). Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp. Dermatol.* 7:1-10
24. Maestrini E, Monaco A, McGrath JA, Ishida-Yamamoto A, Camisa C, Hovnanian A, Lathrop M, Uitto J, Christiano AM (1996). A molecular defect in loricrin, the major component of the cell envelope, underlies Vohwinkel's syndrome. *Nat. Genet.* 13:70–77
25. Maestrini E, Korge BP, Ocana-Sierra J, Calzolari E, Cambiaghi S, Scudder PM et al. (1999). A missense mutation in connexin26, D66H, causes mutilating keratoderma with sensorineural deafness (Vohwinkel's syndrome) in three unrelated families. *Hum. Mol. Genet.* 8:1237–43
26. Sprecher E, Ishida-Yamamoto A, Mizrahi-Koren M, Rapaport D, Goldsher D, Indelman M, Topaz O, Chefetz I, Keren H, O'Brien TJ, et al. (2005). A mutation in SNAP29, coding for a SNARE protein involved in intracellular trafficking, causes a novel neurocutaneous syndrome characterized by cerebral dysgenesis, neuropathy, ichthyosis, and palmoplantar keratoderma. *Am. J. Hum. Genet.* 77:242-251

27. Ungar, D and FM Hughson (2003). SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 19:493-517
28. Beare JM, Nevin NC, Frogatt P, Kernohan DC, Allen IV (1972). Atypical erythrokeratoderma with deafness, physical retardation and peripheral neuropathy. *Br. J. Dermatol.* 87:308-314
29. Owen DJ, Collins BM, Evans PR (2004). Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 20:153-191
30. Boehm M, Bonifacino JS (2001). Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* 12:2907-2920
31. Ohno, H (2006). Physiological roles of clathrin adaptor AP complexes: lessons from mutant animals. *J. Biochem. (Tokyo)*, 139:943-948
32. [www.membres.lycos.fr/.../feuille4.html](http://www.membres.lycos.fr/.../feuille4.html)
33. Traub, LM (2005). Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1744: 415-437
34. Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109:523-535
35. Heldwein EE, Macia E, Wang J, Yin HL, Kirchhausen T, Harrison SC (2004). Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10:14108-14113
36. Hechtman P, Kaplan F, Bayleran J, Boulay B, Andermann E, de Braekeleer M, Melançon S, Lambert M, Potier M, Gagné R (1990). More than one mutant allele causes infantile Tay-Sachs disease in French-Canadians. *Am. J. Hum Genet.* 47: 815-22

37. Westerfield M (1995). *The zebrafish book: a guide for laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon, Eugene
38. Nasevicius A, Ekker SC (2000). Effective targeted gene 'knock-down' in zebrafish. *Nat. Genet.* 26:216-220
39. Bonifacino JS, Glick BS (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153-66
40. Robinson MS (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell. Biol.* 14:167-174
41. Deborde S, Perret E, Gravotta D, Deora A, Salvarezza S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E (2008). Clathrin is a key regulator of basolateral polarity. *Nature* 452:719-723.
42. Ohno H (2006). Clathrin-associated adaptor protein complexes. *J. Cell. Sci.* 119:3719-3721
43. Huizing M, Boissy RE, Gahl WA (2002). Hermansky-Pudlak syndrome: vesicle formation from yeast to man. *Pigment Cell Res.* 6:405-19. Review
44. Tarpey PS, Stevens C, Teague J, Edkins S, O'Meara S, Avis T, Barthorpe S, Buck G, Butler A, Cole J et al. (2006). Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 79:1119-1124
45. Furutani-Seiki M, Jiang YJ, Brand M, Heisenberg CP, Houart C, Beuchle D, van Eeden FJ, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M et al. (1996). Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 229-239
46. Lee H, Kimelman D (2002). A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish. *Dev. Cell.* 2:607-616

47. O'Toole EA (2001). Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin. Exp. Dermatol.* 26:525-530
48. Bryant DM, Stow JL (2004). The ins and outs of E-cadherin trafficking. *Trends Cell Biol.* 8:427-34
49. Imboden M, Goblet C, Korn H, Vríz S (1997). Cytokeratin 8 is a suitable epidermal marker during zebrafish development. *C.R. Acad. Sci. II* 320:689-700
50. Conrad M, Lemb K, Schubert T, Markl J (1998). Biochemical identification and tissue-specific expression patterns of keratins in the zebrafish *Danio rerio*. *Cell Tissue Res.* 293:195-205
51. Saint-Amant L, Drapeau P (1998). Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J. Neurobiol.* 37:622-632
52. Buss RR, Drapeau P (2001). Synaptic drive to motoneurons during fictive swimming in the developing zebrafish. *J. Neurophysiol.* 86:197-210
53. Szabo A, Dalmau J, Manley G, Rosenfeld M, Wong E, Henson J, Posner JB, Furneaux HM (1991). HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* 67:325-333
54. Burrill JD, Moran L, Goulding MD, Saueressig H (1997). PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+29 interneurons that require PAX6 for their development. *Development* 124:4493-4503
55. Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron*, 23:659-674

56. Janvier K, Kato Y, Boehm M, Rose JR, Martina JA, Kim BY, Venkatesan S, Bonifacino JS (2003). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J. Cell Biol.* 163:1281-1290
57. Folsch H (2005). The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells. *Trends Cell. Biol.* 15:222-228
- 58 Carney TJ, von der Hardt S, Sonntag C, Amsterdam A, Topczewski J, Hopkins N, Hammerschmidt M (2007). Inactivation of serine protease Matriptase1 a by its inhibitor Hail is required for epithelial integrity of the zebrafish epidermis. *Development* 134:3461-3471
59. Webb AE, Sanderford J, Frank D, Talbot WS, Driever W, Kimelman D (2007). Laminin alpha is essential for the formation of the zebrafish fins. *Dev. Biol.* 311: 369-382
60. Bonanomi D, Benfenati F, Valtorta F (2006). Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Prog. Neurobiol.* 80:177-217
61. Nakatsu F, Okada M, Mori F, Kumazawa N, Iwasa H, Zhu G, Kasagi Y, Kamiya H, Harada A, Nishimura K, Takeuchi A, Miyazaki T, Watanabe M, Yuasa S, Manabe T, Wakabayashi K, Kaneko S, Saito T, Ohno H (2004). Defective function of GABA-containing synaptic vesicles in mice lacking the AP-3B clathrin adaptor. *J. Cell Biol.* 167(2): 293-302
62. Kantheti P, Qiao X, Diaz ME, Peden AA, Meyer GE, Carskadon SL, Kapfhammer D, Sufalko D, Robinson MS, Noebels JL, Burmeister M (1998). Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* 21:111-122
63. Scheuber A, Rudge R, Danglot L, Raposo G, Binz T, Poncer JC, Galli T (2006). Loss of AP-3 function affects spontaneous and evoked release at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:16562-16567

64. Nakatsu F, Ohno H (2003). Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell. Struct. Funct.* 28:419-429
65. Lee SH, Liu L, Wang YT, Sheng M (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36:661-674
66. Kastning K, Kukhtina V, Kittler JT, Chen G, Pechstein A, Enders S, Lee SH, Sheng M, Yan Z, Haucke V (2007). Molecular determinants for the interaction between AMPA receptors and the clathrin adaptor complex AP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:2991-2996
67. Horikawa HP, Kneussel M, El Far O, Betz H (2002). Interaction of synaptophysin with the AP-1 adaptor protein gamma-adaptin. *Mol. Cell. Neurosci.* 21:454-462
68. Kim MH, Hersh LB (2004). The vesicular acetylcholine transporter interacts with clathrin-associated adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J. Biol. Chem.* 279:12580-12587
69. Nakagawa T, Setou M, Seog D, Ogasawara K, Dohmae N, Takio K, Hirokawa N (2000). A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 103:569-581
70. Hirokawa N, Takemura R (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 6:201-214
71. Tanaka Y, Hirokawa N (2002). Mouse models of Charcot-Marie-Tooth disease. *Trends Genet.* 18:S39-S44
72. Folsch H, Pypaert M, Maday S, Pelletier L, Mellman I (2003). The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *J. Cell Biol.* 163:351-362

73. Gan Y, McGraw TE, Rodriguez-Boulan E (2002). The epithelial specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat. Cell Biol.* 4: 605-609
74. Valencia JC, Watabe H, Chi A, Rouzaud F, Chen KG, Vieira WD, Takahashi K, Yamaguchi Y, Berens W, Nagashima K et al (2006). Sorting of Pmel17 to melanosomes through the plasma membrane by AP1 and AP2: evidence for the polarized nature of melanocytes. *J. Cell Sci.* 119:1080-1091
75. Zhu Y, Traub LM, Kornfeld S (1998). ADP-ribosylation factor 1 transiently activates high-affinity adaptor protein complex AP-1 binding sites on Golgi membranes. *Mol. Biol. Cell* 9:1323-1337
76. Barrallo-Gimeno A, Holzschuh J, Driever W, Knapik EW (2004). Neural crest survival and differentiation in zebrafish depends on mont blanc/tfap2 gene function. *Development* 131:1463-1477.33
77. Grant B, Hirsh D (1999). Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol. Biol. Cell* 10(12):4311-26
78. Shim J, Sternberg PW, Lee J (2000). Distinct and redundant functions of medium chains of the AP-1 clathrin associated protein complex in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* 11:2743-2756
79. Gonzalez-Gaitan M, Jäckle H (1997). Role of *Drosophila* alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling. *Cell* 88(6):767-76
80. Mitsunari T, Nakatsu F, Shioda N, Love PE, Grinberg A, Bonifacino JS, Ohno H (2005). Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol Cell Biol.* 25(21):9318-23



81. Feng L, Rigatti BW, Novak EK, Gorin MB, Swank RT (2000). Genomic Structure of the Mouse Ap3b1 Gene in Normal and Pearl Mice. *Genomics* 1:69 (3):370-9
82. Nesterov A, Carter RE, Sorkina T, Gill GN, Sorkin A (1999). Inhibition of the receptor-binding function of clathrin adaptor protein AP-2 by dominant-negative mutant mu2 subunit and its effects on endocytosis. *EMBO J.* 18(9):2489-99
83. Mitsunari T, Nakatsu F, Shioda N, Love PE, Grinberg A, Bonifacino JS, Ohno H (2005). Clathrin adaptor AP-2 is essential for early embryonal development. *Mol. Cell Biol.* 25(21):9318-23
84. Conner SD, Schmid SL (2003). Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *Cell Biol.* 162(5):773-9
85. Owen DJ, Vallis Y, Noble ME, Hunter JB, Dafforn TR, Evans PR, McMahon HT (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell* 97(6):805-15
86. Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell.* 3(1):11-21
87. Zizioli D, Meyer C, Guhde G, Saftig P, von Figura K, Schu P (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J. Biol. Chem.* 274(9):5385-90
88. Meyer C, Zizioli D, Lausmann S, Eskelinen EL, Hamann J, Saftig P, von Figura K, Schu P. (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J.* 19(10):2193-203
89. Eskelinen EL, Meyer C, Ohno H, von Figura K, Schu P (2002). The polarized epithelia-specific mu 1B-adaptin complements mu 1A-deficiency in fibroblasts. *EMBO Rep.* 3(5):471-7

90. Rodriguez-Boulan E, Kreitzer G, Müsch A (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6(3):233-47
91. Bonifacino JS, Traub LM (2003). Signals for sorting of the transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:395-447
92. Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* 114:299-310
93. Ghosh P, Kornfeld S (2003). AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation. *J. Cell Biol.* 160:699-708
94. Ohno H, Tomemori T, Nakatsu F, Okazaki Y, Aguilar RC, Foelsch H, Mellman I, Saito T, Shirasawa T, Bonifacino JS (1999). Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* 449(2-3):215-20
95. Folsch H, Ohno H, Bonifacino JS, Mellman I (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99:189-198
96. Roush DL, Gottardi CJ, Naim HY, Roth MG, Caplan MJ (1998). Tyrosine-based membrane protein sorting signals are differentially interpreted by polarized Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273(41):26862-9
97. Simmen T, Honing S, Icking A, Tikkanen R, Hunziker W (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat. Cell Biol.* 4:154-159
98. Gravotta D, Deora A, Perret E, Oyanadel C, Soza A, Schreiner R, Gonzalez A, Rodriguez-Boulan E (2007). AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 104(5):1564-9

99. Theos AC, Tenza D, Martina JA, Hurbain I, Peden AA, Sviderskaya EV, Stewart A, Robinson MS, Bennett DC, Cutler DF, Bonifacino JS, Marks MS, Raposo G (2005). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol. Biol. Cell* 16:5356-5372
100. Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J. Cell Biol.* 152:809-824