

Université de Montréal

**Pathogenèse moléculaire de la Neuropathie Sensitive et
Motrice Héritaire avec Agénésie du Corps Calleux**

par

Adèle Salin

Département de Biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Ph.D

en Biologie Moléculaire

Septembre 2010

© Adèle Salin, 2010

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Pathogenèse moléculaire de la Neuropathie Sensitive et Motrice Héritaire avec Agénésie
du Corps Calleux

Présentée par :
Adèle Salin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Richard Bertrand, président-rapporteur

Dr. Guy A. Rouleau, directeur de recherche

Dr. Graziella Di Cristo, membre du jury

Dr. Nada Jabado, examinateur externe

Dr. Edward Bradley, représentant du doyen

Résumé

La neuropathie sensitive et motrice héréditaire avec agénésie du corps calleux (NSMH/ACC) se traduit par une atteinte neurodégénérative sévère associée à des anomalies développementales dans le système nerveux central et du retard mental. Bien que rare dans le monde, ce désordre autosomique récessif est particulièrement fréquent dans la population Québécoise du Canada Français du fait d'un effet fondateur. L'unique étude réalisée sur la mutation québécoise du gène qui code pour le co-transporteur de potassium-chlore 3 (KCC3) a montré qu'il y a une perte de fonction de la protéine. Cependant, la maladie est également retrouvée hors du Québec et il reste encore à élucider les pathomécanismes mis en jeu.

Nous avons donc séquencé les 26 exons du gène *KCC3* chez des individus recrutés dans le monde entier et suspectés d'être atteints de la maladie. Nous avons ainsi identifié trois nouvelles mutations. L'étude fonctionnelle de ces mutations nous a confirmé la perte de fonction systématique des co-transporteurs mutés. Puisque l'inactivation de *KCC3* se produit majoritairement via l'élimination de segments peptidiques en C-terminus, nous avons concentré notre attention sur l'identification des interactions qui s'y produisent. À l'aide d'approches double hybride, pull-down et immunomarquage, nous avons déterminé que *KCC3* interagit avec la créatine kinase CK-B et que cette interaction est perturbée par les mutations tronquantes. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de créatine kinase inactive *KCC3*, ce qui démontre qu'il existe bien un lien fonctionnel et pathologique entre *KCC3* et ses partenaires C-terminaux. Nous avons aussi identifié des anomalies majeures de localisation membranaire des *KCC3* mutés. Que *KCC3* soit tronqué ou pleine longueur, sa distribution subcellulaire est affectée dans des cellules en culture, dans les ovocytes de *Xenopus* et dans des échantillons de cerveau de patients. La perte d'interaction entre *KCC3* et CK-B et/ou les défauts de transit intracellulaire de *KCC3* sont donc les mécanismes pathologiques majeurs de la NSMH/ACC.

Mots-clés : maladie génétique, neuropathie, interaction protéique, pathomécanisme, transit protéique, neurodégénérescence, neurodéveloppement

Abstract

Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC) is a severe neurodegenerative disease associated with developmental anomalies in the central nervous system and mental retardation. Although rare worldwide, this autosomal-recessive disorder is frequent in the French-Canadian population of Quebec because of a founder effect. Different mutations in the gene coding for the potassium-chloride co-transporter 3 (KCC3) have been associated with the disease; however, little is known about the mechanisms leading to the inactivation of the co-transporter.

We sequenced 26 exons of the *KCC3* gene in individuals recruited worldwide and suspected to be affected by the disease. We identified three new mutations. The functional study of these mutations gave confirmation of a systematic loss-of-function of the mutant co-transporters. As the loss of function occurs mainly via the elimination of C-terminal peptide fragments, we focused on the identification of C-terminal interacting partners. Using different biochemical approaches, such as yeast two-hybrid, pull-down, and immunostaining, we established that KCC3 interacts with the brain-type creatine kinase CK-B and that this interaction is disrupted by the HMSN/ACC truncation mutations. In addition, a specific creatine kinase inhibitor inactivates KCC3 and shows for the first time the functional link between KCC3 and its C-terminal partners. In addition, we found that anomalies in KCC3 transit—as seen in cultured cells, in *Xenopus* oocytes, and in human brain samples—is a major pathogenic mechanism that also leads to the disease manifestations.

Loss of interaction between KCC3 and CK-B and intracellular transit defects of the cotransporter are, therefore, major pathologic mechanisms in HMSN/ACC.

Keywords : Genetic disease, neuropathy, pathomechanism, protein–protein interaction, protein transit, neurodegeneration, neurodevelopment

Table des matières

AVANT-PROPOS.....	1
INTRODUCTION.....	3
1. LES NEUROPATHIES SENSITIVO-MOTRICES HEREDITAIRES.....	4
1.1 <i>Neuropathies périphériques</i>	4
1.2 <i>Les NSMH</i>	8
2. LA NSMH/ACC.....	14
2.1 <i>Nomenclature</i>	14
2.2 <i>Historique</i>	14
2.3 <i>Diagnostique et prise en charge</i>	15
3. LA FAMILLE SLC12.....	19
3.1 <i>Généralités</i>	19
3.2 <i>Les co-transporteurs de chlore couplé au sodium</i>	21
3.3 <i>Les co-transporteurs de chlore couplé au potassium</i>	25
3.4 <i>Membres orphelins</i>	28
4. MECANISMES D'INACTIVATION DES CCCS.....	30
4.1 <i>Généralités</i>	30
4.2 <i>NCC</i>	33
4.3 <i>NKCC2</i>	34
4.4 <i>KCC3</i>	35
5. AGENESIE DU CORPS CALLEUX CHEZ L'HUMAIN.....	37
5.1 <i>Développement du corps calleux</i>	37
5.2 <i>Agénésie du corps calleux</i>	37
OBJECTIFS DU PROJET DE THESE.....	40
RESULTATS.....	42
ARTICLE 1.....	43
<i>Troncatures distales chez des patients NSMH/ACC</i>	43
ARTICLE 2.....	67

<i>Interaction de KCC3 avec la créatine kinase spécifique au cerveau.....</i>	67
ARTICLE 3	103
<i>Identification des différents mécanismes d'inactivation de KCC3 dans le syndrome NSMH/ACC.....</i>	103
ARTICLE 4	143
<i>Implication physiologique du co-transporteur de potassium-chlore 3 dans l'intégrité des nerfs.....</i>	143
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	172
<i>Identification d'autres protéines pouvant interagir avec le domaine C-terminal de KCC3</i>	172
<i>Introduction.....</i>	173
<i>Matériel et méthodes.....</i>	175
<i>Résultats.....</i>	178
<i>Discussion.....</i>	188
<i>Données supplémentaires.....</i>	194
CONCLUSION.....	208
SYNOPSIS	209
<i>Identification de la mutation qui cause la NSMH/ACC le plus communément hors du Québec</i>	209
<i>La perte des 140 derniers acides aminés de KCC3 mène à sa perte de fonction.....</i>	210
<i>Les 18 derniers acides aminés de KCC3 permettent une interaction directe et fonctionnelle avec CK-B.....</i>	210
<i>L'identification de la mutation NSMH/ACC la plus distale appuie l'importance fonctionnelle de l'interaction entre KCC3 et CK-B.....</i>	212
<i>La rétention dans le RE est un mécanisme d'inactivation de KCC3.....</i>	213
<i>Le C-terminus pourrait permettre des interactions physiques avec des éléments du cytosquelette.....</i>	214
DISCUSSION	216
<i>Corrélation génotype-phénotype.....</i>	216
<i>Autres facteurs de variabilité phénotypique.....</i>	219
<i>Aller vers une meilleure compréhension de la relation structure-fonction de KCC3.....</i>	222
<i>Aller vers une meilleure gestion de la maladie.....</i>	223

CONCLUSION GENERALE 226

BIBLIOGRAPHIE 228

ANNEXES I

Liste des tableaux

Tableau I	Liste de maladies pouvant être associées à des neuropathies.....	6
Tableau II	Sous-types de neuropathies sensitives et motrices héréditaires (NSMH) et les protéines mutées qui y sont associées.....	12
Tableau III	Fonction, maladies associées et modèles animaux des membres de la famille de co-transporteurs SLC12.....	29
Tableau IV	Mutations déjà identifiées dans le gène KCC3 en 2004.....	36
Tableau V	Anomalies pouvant être à l'origine de l'agénésie du corps calleux.....	38
Tableau VI	Liste des motifs contenus dans le C-terminus de KCC3 qui sont reconnus <i>in silico</i>	178
Tableau VII	Liste des domaines SH3 capables d'interaction forte avec le peptide KCC3 sauvage pour le motif mPR.....	184
Tableau VIII	Liste des partenaires candidats identifiés et les approches utilisées.....	192
Tableau IX	Candidats obtenus par séquençage LC-MSMS après GST pull-down.....	194
Tableau X	Conséquences d'une expression anormale de KCC3.....	206
Tableau XI	Tableau clinique classiquement observé chez les patients NSMH/ACC québécois.....	221

Liste des figures

Figure 1	Évolution de la NSMH/ACC.....	16
Figure 2	Représentation schématique des transporteurs et canaux ioniques activés par le gonflement cellulaire.....	20
Figure 3	Représentation schématique du lien entre la maturation neuronale, le type de réponse au GABA et l'activité des co-transporteurs électroneutres.....	23
Figure 4	Structure globale de KCC3 et mutations NSMH/ACC connues en 2004....	27
Figure 5	Mécanismes d'inactivation de transporteurs d'ions.....	31
Figure 6	Conservation du motif PR entre espèces.....	180
Figure 7	Le motif PR est important pour la fonction de KCC3.....	181
Figure 8	La mutagenèse du motif PR affecte la localisation de KCC3 aux extensions cellulaires.....	182
Figure 9	Profil d'interaction entre le 15mère de KCC3 contenant le motif poly-proline et des domaines SH3 connus (SH3-array I).....	183
Figure 10	Évidences de l'interaction entre KCC3 et la protéine à domaine SH3, Vav2.....	187
Figure 11	La microtubule associated protein 1B (MAP1B) interagit avec le C-terminus de KCC3.....	189
Figure 12	Immuno-marquage de MAP1B dans le cerveau de patients NSMH/ACC (Pons).....	190
Figure 13	Profil d'interaction entre le 15mère de KCC3 contenant le motif poly-proline et des domaines SH3 connus (SH3-array II et III).....	206
Figure 14	Les variations de tonicité mènent à des remaniements spectaculaires du cytosquelette cortical.....	207
Figure 15	Mutations identifiées et partenaires d'interaction directe suspectés en fin de projet.....	226
Figure 16	Mécanismes putatifs qui mènent à des défauts de régulation du volume axonal dans la NSMH/ACC.....	227

À mon époux, Fabrice

Remerciements

Je vais remercier tout d'abord le Dr Guy Rouleau pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire et pour ses conseils qui m'ont guidée tout au long de ce travail de recherche. Mes remerciements à la fondation Jumelles Coudé et à ses fondateurs M. Alain Coudé et Mme Louise Gagné qui ont apporté sans relâche le soutien financier ayant permis de mener ce travail jusqu'au bout.

À tous mes collègues au laboratoire.

Un grand merci à Claudia Gaspar pour son soutien professionnel et personnel ainsi que pour l'encadrement de ce travail qui n'en a pas passionné beaucoup. Je remercie également Patrick Dion pour ses conseils au cours de ces nombreuses années de travail qui ont été ponctuées par bien des conversations totalement hors sujet.

Parmi mes collègues, je remercie en particulier Janet Laganière pour son support technique et son extrême gentillesse que ce soit dans et hors du laboratoire. Un grand merci à Rébecca Gaudet pour son intense support technique, son amitié, pour nos nombreux échanges qui ne concernaient pas que le travail, mais alors là pas du tout... J'envoie une pensée particulière à Liliane Karéméra qui a maintenant quitté le laboratoire mais qui a été la première à me donner des petits coups de mains. Je remercie aussi Daniel Rochefort et Pascale Hince, dont l'impressionnante expérience professionnelle m'a été très utile.

Merci à Jean-Baptiste Rivière qui a partagé avec moi la même galère (produire les premières thèses de doctorat du laboratoire soumises à l'université de Montréal !) mais surtout pour notre sympathique et fructueuse collaboration. Je remercie Sébastien Holbert pour sa participation au projet, en particulier sa grande expérience dans le double hybride a été essentielle à la découverte de MAP1B. Et merci à Masoud Shekarabi pour cette longue collaboration de 5 ans dans l'équipe «ACCPN ».

Je tiens à remercier grandement le Dr Lapointe pour sa supervision des travaux d'études fonctionnelles de KCC3 ainsi que son équipe, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. J'ai eu le privilège de disposer de la disponibilité technique de François M.

Charron et Sandra Dacal qui ont mis beaucoup en œuvre pour obtenir des résultats publiables pour les études réalisées dans les oocytes de *Xenope*.

J'envoie des remerciements tout particuliers à mes précédents superviseurs sans qui je ne serais pas arrivé là aujourd'hui. Le Dr Alain Aurias pour sa gentillesse, son support, son amitié, son excellente supervision lors de mon DEA et bien entendu pour l'aide considérable qu'il a apportée pour que je puisse réaliser mon rêve de vivre au Canada. Le Dr Philippe Bois pour son « peps », sa bonne humeur, ses enseignements et son soutien absolument sans faille. Le Dr Serge Romana pour son amitié, son parrainage, son support et sa supervision.

En écrivant ces remerciements, je pense aussi à mon frère Frank, mes nièces Baliri et Ixora et à mes amis qui sont bien loin : Vanessa (Brisbane, Australie), ma témoin préférée, Rachel (Paris) et Sandra (Guadeloupe) mes amies de toujours, David (Paris) mon ami et 'conseiller professionnel' pour n'en citer que quelques uns. Ils m'ont tous à leur manière soutenue à distance tout au long de ce doctorat.

Enfin, ce travail je le dois surtout à mes parents, ma mère France-Lise et mon père Jacques qui m'ont donné tous les outils intellectuels et autres supports qui étaient à leur disposition, mais aussi leur propre motivation pour que j'atteigne ce niveau éducatif. Cet achèvement, je le dois aussi à mes grands-mères qui ont toujours cru en moi, ainsi qu'à toute ma famille que ce soit les de Blaine et les Salin. Mais je ne serais pas parvenue à compléter ce travail sans toute l'aide et le support de mes beaux-parents (merci infiniment Mireille pour la relecture). Et pour finir, je remercie mon Fabrice qui est mon rock, mon piler, mon repère dans tout ce que j'ai voulu entreprendre et qui a toujours cru en moi, bien plus que moi-même bien des fois.

Pensée pour mon petit trésor, Léonie...

Abbreviations

a.a.	acide aminé
ACCPN	agenesis of the corpus callosum associated with peripheral neuropathy
ADP	adénosine di-phosphate
ADN	acide desoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANOVA	analysis of variance
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine tri-phosphate
AVC	agmentation du volume cellulaire
CAT	computerized axial tomography
CCC	co-transporteur de cation-chlore
CK-B	brain-type Creatine kinase; créatine kinase cerveau-spécifique
Cl ⁻	chlore
CMT	Charco-Marie-Tooth
CTD	C-terminal domain
DNFB	2,4-Di-Nitro Fluoro Benzène
<i>e.g.</i>	<i>exemplii gratia</i> , signifie “par exemple”
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , signifie “et d’autres”
GAN	Giant axonal neuropathy
GABA	acide γ -aminobutyrique
GEF	guanosine exchange factor

GST	glutathion S-transférase
H	histidine
IRM	imagerie par résonance magnétique nucléaire
K ⁺	potassium
KCC	co-transporteur de potassium-chlore
kDa	kilo Dalton
L	leucine
MAP1B	microtubule associated protein 1B
Na ⁺	sodium
NCC	co-transporteur de sodium-chlore
NKCC	co-transporteur de sodium-potassium-chlore
OMIM	online mendelian inheritance in man
R	arginine
Rb ⁺	rubidium
RE	réticulum endoplasmique
RVC	réduction du volume cellulaire
SH3	Src homology 3
SLC	solute carrier
SNC	système nerveux central
SNP	système nerveux périphérique
T	thréonine
W	tryptophane
X	codon stop

Y2H yeast two-hybrid

Avant-propos

Ce n'est qu'exceptionnellement qu'on entend parler de la neuropathie sensitive et motrice héréditaire avec agénésie du corps calleux (NSMH/ACC) et ceci même sous ses autres dénominations plus courantes de syndrome Andermann ou d'agénésie du corps calleux avec polyneuropathie (ACCPN). Il s'agit pourtant d'une maladie neurodégénérative très sévère qui conduit à l'invalidité dès l'adolescence et à la mort précoce des jeunes adultes atteints. Ce désordre a, de plus, une incidence importante dans la province du Québec où il est particulièrement fréquent dans la région du Saguenay-Lac St. Jean et le comté de Charlevoix (un adulte sur 23 en est porteur). Enfin, d'un point de vue neuroscientifique, la NSMH/ACC a un intérêt indéniable puisqu'il s'agit d'une maladie monogénique associant des problèmes neurodéveloppementaux et des processus neurodégénératifs complexes.

En 2002, l'identification de *KCC3* comme le gène responsable de la maladie par l'équipe du Dr Guy Rouleau a été une avancée majeure qui suggérait enfin l'élimination éventuelle de cette lourde maladie du Québec. Pourtant, bien que la prévention et le diagnostique de la maladie aient fait un bond considérable avec cette découverte génétique, des problèmes de détection et de gestion des malades persistent encore. En effet, bien que l'impact n'en soit que relatif, il est quasiment impossible pour l'instant de prévenir les cas qui se manifestent ailleurs dans le monde. De plus, des centaines d'enfants et de jeunes adultes de la région du Saguenay-Lac St. Jean tentent encore à ce jour de vivre avec cette pathologie sévère.

Les différentes approches thérapeutiques envisagées sont totalement inefficaces. C'est pourquoi les efforts de la Recherche sur le sujet s'orientent aujourd'hui vers la découverte de traitements adéquats. Malheureusement le lien entre *KCC3* et les différentes manifestations de la neuropathie n'est pas clair, c'est pourquoi une des étapes allant vers un traitement efficace est d'identifier les différents phénomènes moléculaires qui mènent à la dysfonction de *KCC3* afin d'arriver un jour à les corriger.

C'est sur ces bases qu'a débuté mon projet de doctorat, et le travail présenté ici s'inscrit totalement dans l'optique d'identification des pathomécanismes qui mènent à la perte de fonction de *KCC3* dans la NSMH/ACC. Heureusement, des avancées majeures

dans la compréhension de pathomécanismes ont été faites pour d'autres transporteurs ou canaux d'ions, et celles-ci ont mené à de nouvelles approches thérapeutiques. Nous avons donc pris l'initiative de nous appuyer sur ces connaissances qui ont été accumulées sur les processus d'inactivation d'autres transporteurs ioniques pour nous aider à comprendre l'inactivation de KCC3.

Nous pensons qu'il sera essentiel de corriger les mécanismes qui mènent au dysfonctionnement de KCC3 à l'aide, par exemple, de drogues qui restitueront la fonction totale ou partielle du co-transporteur. Et peut-être parviendrons-nous un jour à prévenir l'apparition des symptômes de la maladie ou, au mieux, à soulager les individus atteints.

Introduction

La NSMH/ACC est une neuropathie sévère et progressive qui s'accompagne d'anomalies neurodéveloppementales et de traits dysmorphiques. Elle est transmise de façon autosomique récessive et elle s'apparente au grand groupe des maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Elle rentre dans la catégorie des neuropathies sensitives et motrices héréditaires, dont elle est une forme axonale. La prévalence de la NSMH/ACC est particulièrement élevée dans la population Canadienne Française du comté de Charlevoix et de la région du Saguenay-Lac-St-Jean au Québec, du fait d'un effet fondateur. C'est d'ailleurs l'étude de familles Québécoises par l'équipe du Dr Rouleau qui a permis d'établir que la maladie est transmise *via* des mutations dans le gène *SLC12A6* ou *KCC3*. Le gène *KCC3* code pour le co-transporteur de potassium-chlore 3 (KCC3). KCC3, comme d'autres membres de la famille SLC12, s'oppose aux variations de volume cellulaire qui sont liées à une accumulation d'eau et participe à l'homéostasie des ions potassium et chlore. Cependant, l'implication du co-transporteur dans le développement du système nerveux central ou encore les différentes facettes de son rôle dans la maintenance du système nerveux ne sont pas bien comprises.

Cette section est consacrée à l'introduction des connaissances de base sur la NSMH/ACC et sur le co-transporteur KCC3. Ainsi, au cours de cet exposé, tout d'abord seront présentés le groupe des neuropathies périphériques dans lequel s'inscrit la NSMH/ACC et les caractéristiques des protéines qui causent les neuropathies sensitives et motrices héréditaires, lesquelles seront vues un peu plus en détail. Ensuite, je fournirai une description des membres de la famille SLC12 – dont fait partie KCC3 – en insistant sur leurs rôles connus et suggérés dans le système nerveux, ainsi que sur les mécanismes cellulaires connus qui mènent à leur inactivation. Enfin, un aparté sera offert sur le

développement du corps calleux et surtout sur son agénésie, puisqu'il s'agit d'une anomalie encore très mal comprise et qui est récurrente dans la NSMH/ACC.

1. Les neuropathies sensitivo-motrices héréditaires

1.1 Neuropathies périphériques

1.1.1 Généralités

Neuropathie est un terme médical qui caractérise, au sens large, l'ensemble des affections nerveuses. On distingue les mononeuropathies (un seul nerf touché), les mononeuropathies multiples (plusieurs nerfs), et les polyneuropathies (atteinte diffuse de l'ensemble des nerfs, qu'on retrouve dans la NSMH/ACC). La neuropathie est dite 'périphérique' lorsqu'elle affecte le système nerveux périphérique. Ce dernier est composé des fibres qui innervent les muscles, la peau et les organes internes en les connectant à la moelle épinière. Ces fibres nerveuses sont classées suivant leur vitesse de conduction de l'information nerveuse, leur état de myélination, leur taille mais aussi et surtout par leur fonction (Gasser et al. 1941). On distingue ainsi les nerfs moteurs (c'est-à-dire qu'ils transportent l'influx nerveux depuis le système nerveux central vers les organes effecteurs tels que les muscles), les nerfs sensitifs (c'est-à-dire qu'ils transportent l'influx nerveux depuis les récepteurs sensoriels vers le système nerveux central) et les nerfs autonomiques (c'est-à-dire qu'ils contrôlent les fonctions autonomiques telles que la digestion et la sudation). Les neuropathies périphériques sont fréquentes, surviennent chez environ 2,4% de la population et leur incidence augmente avec l'âge (Hughes 2002). Le cours de la neuropathie est variable; la maladie peut apparaître et disparaître, progresser lentement au

cours de nombreuses années, ou devenir rapidement sévère et invalidante, comme dans le cas de la NSMH/ACC (pour des précisions complémentaires sur l'évolution de cette maladie, voir le *paragraphe 2* de ce chapitre d'*Introduction*).

1.1.2 Les symptômes

Les symptômes dépendent du type de nerfs qui est endommagé et peuvent n'être vus qu'au bout de plusieurs jours, semaines ou années.

Les nerfs moteurs contrôlent les mouvements de tous les muscles dans des actions telles que la marche, la préhension et la parole. C'est pourquoi la faiblesse musculaire est le symptôme le plus commun d'un dommage au nerf moteur. D'autres symptômes incluent des crampes douloureuses et des fasciculations (contraction musculaire incontrôlée visible sous la peau), perte de muscle, dégénérescence osseuse et changements cutanés.

Les nerfs sensoriels transmettent l'information des expériences sensorielles, telles que le toucher léger ou la douleur à la suite d'une coupure. Les dommages aux larges fibres sensorielles myélinisées, qui enregistrent les vibrations, le toucher léger et le sens du positionnement, donnent une impression d'engourdissement, en particulier au niveau des pieds et des mains. Ces anomalies peuvent contribuer à la perte de réflexes, comme dans le cas de dommages aux nerfs moteurs. La perte du sens de la position rend souvent les individus incapables de coordonner leurs mouvements lors de la marche ou de maintenir leur équilibre les yeux fermés. Les dommages faits aux petites fibres nerveuses non-myélinisées interfèrent avec la perception de la douleur ou les changements de température. L'amputation est fréquente puisque les individus ont du mal à ressentir une coupure ou une plaie qui s'infecte.

Les nerfs autonomiques régulent les activités biologiques que l'on ne contrôle pas consciemment, telle que la respiration, la digestion et les fonctions des glandes ou du cœur. Les dommages aux nerfs autonomiques causent des symptômes divers qui dépendent de l'organe ou glande concernés. Les symptômes les plus banals incluent l'impossibilité de transpirer normalement, ce qui conduit à une intolérance à la chaleur; la perte du contrôle

de la vessie et de l'incontinence; une incapacité à contrôler les muscles qui contractent les vaisseaux sanguins, ce qui mène à des niveaux de pression sanguine anormaux.

Bien que certaines neuropathies affectent ces trois types de nerfs, généralement ne sont affectés que un ou deux types à la fois. Ainsi, , pour décrire la condition des patients qui présentent des symptômes indiqués ci-dessus, les médecins parlent par exemple d'une neuropathie essentiellement motrice, d'une neuropathie essentiellement sensorielle ou d'une neuropathie sensitivo-motrice (comme dans le cas de la NSNH/ACC).

1.1.3 Les causes

La neuropathie périphérique peut être héréditaire ou acquise (**Tableau I**).

Tableau I

Liste de maladies pouvant être associées à des neuropathies.

Formes héréditaires	Maladie de Charcot-Marie-Tooth Ataxie de Friedreich NSMH/ACC
Formes acquises	Diabète Carence en vitamines Alcoolisme Tumeurs Infection virale (VIH, Hépatite) Infection bactérienne (Diptérie, Lèpre, Syphilis) Polyarthrite rhumatoïde Substances toxiques Effets secondaires suite à la prise d'un médicament

Catalogue non exhaustif de maladies pouvant être associées à des neuropathies.

L'origine des formes acquises est très variable et inclue les traumatismes ou blessures physiques à un nerf, comme par exemple à la suite d'un accident automobile, une chute ou après des activités sportives. Des cancers ou tumeurs bénignes peuvent aussi causer ces symptômes en faisant pression sur les fibres nerveuses (*e.g.*, neurofibromatose, neurome). Une exposition à des neurotoxines (telles que l'arsenic, le plomb, le mercure ou

le thallium), de réactions auto-immunes, après une infection virale (*e.g.*, virus de l'herpès, VIH) ou bactérienne (diphtérie, lèpre), des carences nutritionnelles (*e.g.*, vitamines E, B1, B6, B12 et niacin) et enfin des désordres vasculaires et métaboliques (*e.g.*, diabète, déséquilibre hormonal, désordre rénal) sont des tous des facteurs à l'origine de ce genre de dommages. Cependant, dans de nombreux cas la cause spécifique de la maladie ne peut pas être identifiée et on parle alors de neuropathie idiopathique.

Les formes héréditaires sont causées par des mutations génétiques. Certaines de ces formes ne conduisent qu'à des neuropathies modérées avec des symptômes qui commencent à la maturité et qui n'aboutissent qu'à des déficiences mineures. Par contre, les maladies les plus sévères se manifestent souvent dès l'enfance et sont souvent léthales. Les formes les plus communes constituent le groupe des neuropathies sensitives et motrices héréditaires (NSMH) aussi référées sous le nom de maladies Charcot-Marie-Tooth (CMT) (strurtz et al. 1992).

Les NSMH sont des désordres cliniquement, pathologiquement et génétiquement hétérogènes qui se manifestent par une dégénérescence progressive du système nerveux périphérique (Berger et al. 2002). Elles sont parmi les maladies héréditaires les plus fréquentes impliquant le système nerveux périphérique, avec une fréquence estimée à 1/2500 individus (Phillips et al. 1999, Chance et al. 2000). Comme je le présente en détail plus bas, les neuropathies résultent souvent de mutations dans des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la production et de la maintenance des neurones ou de la gaine de myéline. Les principales manifestations cliniques qui sont communes aux NSMH incluent de l'affaiblissement, de la perte musculaire dans le bas des jambes et dans les pieds, la perte des réflexes tendineux, des engourdissements et/ou de la perte de sensations dans les membres inférieurs (Phillips et al. 1999).

Comme les NSMH peuvent être classés en neuropathies essentiellement démyélinisantes ou axonales (neuronales) suivant les structures qui sont touchées, nous suivrons cette classification pour en parler plus en détail.

1.2 Les NSMH

1.2.1 Les formes démyélinisantes autosomiques dominantes

Les NSMH démyélinisantes autosomiques dominantes correspondent au plus grand sous-groupe de NSMH. Elles sont causées par des anomalies de la gaine de myéline entourant les nerfs périphériques et on y observe souvent l'apparition de structures en bulbes d'oignons. Généralement, les mutilations faites à la myéline sont si sévères qu'elles conduisent à une diminution marquée de la vitesse de la conduction nerveuse (Chance et al. 2000). Comme pour toutes les neuropathies motrices, ces formes se manifestent toujours par des faiblesses et des atrophies musculaires qui touchent préférentiellement les muscles péronéens et distaux. Il a de plus été montré par des études électrophysiologiques que les potentiels d'action qui sont générés par les nerfs sensoriels sont anormaux (Birouk et al. 1997).

Les mutations mises en jeu touchent essentiellement des gènes qui vont coder pour des protéines impliquées dans la structure de la gaine de myéline ce qui mène à une diminution sévère de la vitesse de conduction nerveuse. On y trouve donc des maladies touchant des composants de la myéline comme la PMP22 (peripheral myelin protein -22; OMIM #118220) ou la MPZ (myelin protein zero; OMIM #118200). Dans d'autres cas, ce sont des facteurs de transcription régulant l'expression de protéines structurales qui font défaut comme le facteur de transcription à doigt Zinc EGR2 (early growth response 2; OMIM #607678). Seulement exceptionnellement, ce sont des facteurs de croissance de type TNF qui sont en cause (*e.g.* SIMPLE/LITAF; OMIM #601098).

Il existe aussi des formes autosomiques dominantes qui sont caractérisées par des vitesses de conduction nerveuse intermédiaires. Celles-ci sont essentiellement causées par mutations touchant des gènes qui codent pour des protéines régulatrices du cytosquelette (*e.g.* DNM2 ; OMIM #606482).

1.2.2 Les formes démyélinisantes autosomiques récessives

Les formes autosomiques récessives démyélinisantes de NSMH sont des polyneuropathies rares et sévères. De nombreux sous-types ont été identifiés, tous avec des particularités ethniques, pathologiques et cliniques bien précises. Les protéines mutées sont impliquées dans le développement neuronal et/ou l'entretien de la gaine de myéline.

Les mutations causales vont toucher soit des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'intégrité neuronale comme des protéines de transduction du signal au cours du développement neuronal (*e.g.* ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 ou GDAP1; OMIM #607831) ou impliqué dans le recyclage membranaire des neurones (*e.g.* myotubularin-related protein 2 ou MTMR2; OMIM #601382). De plus, comme pour les formes dominantes, certaines mutations vont mener à des altérations de la gaine de myéline en touchant par exemple des protéines impliquée dans le repliement de la myéline (*e.g.* myotubularin-related protein 13 ou SBF2/MTMR13; OMIM #604563).

1.2.3 Les formes axonales autosomiques dominantes

Les formes axonales autosomiques dominantes de NSMH sont causées par des anomalies primaires de l'axone des nerfs périphériques. Elles se traduisent par une vitesse de conduction nerveuse normale ou seulement légèrement réduite et par la perte de larges fibres myélinisées (De Sandre-Giovannoli et al. 2002).

Les protéines qui sont déficientes ont des fonctions extrêmement variées. Ainsi, on trouve des mutations dans des gènes codant pour des protéines impliquée dans le transport de vésicules synaptiques (*e.g.* kinesin family member 1B ou KIF1B; OMIM #118210). D'autres sont cruciales pour l'intégrité des mitochondries (*e.g.* mitofusin 2 ou MFN2; OMIM #609260). Parfois ce sont des protéines impliquées dans des processus fondamentaux tels que la mort cellulaire programmée (apoptose) (*e.g.* ras-associated protein-7 ou RAB7; OMIM #600882) ou la synthèse protéique (*e.g.* glycyl-tRNA synthetase ou GARS; OMIM #601472). Certaines NSMH autosomiques dominantes axonales sont causées par des mutations dans des gènes codant pour des protéines

structurales (*e.g.* neurofilament protein light polypeptide ou NEFL, protéine structurale des cellules de Schwann et des neurones). Enfin, des mutations causales vont toucher des gènes codant pour des protéines chaperonnes de type « heat-shock », telles que HSPB1 (heat-shock 27-KD protein-1; OMIM #606595) et HSPB8 (heat-shock 22-KD protein 8; OMIM #608673) qui s'opposent toute deux à la formation d'agrégats protéiques intracellulaires.

1.2.4 Les formes axonales autosomiques récessives

Les formes axonales autosomiques récessives de NSMH se caractérisent aussi par une conduction quasi normale de l'influx nerveux. Cependant, elles se distinguent facilement du groupe précédent par le fait que ce sont des maladies qui sont extrêmement rares. Cette catégorie inclut la NSMH/ACC, pour laquelle un descriptif complet est retrouvé dans le *paragraphe 2* de ce chapitre d'*Introduction*.

L'atteinte d'une protéine du cytosquelette appelée la gigaxonine ou GAN1 est d'un intérêt particulier dans ce travail de recherche puisque GAN1 est impliquée dans une neuropathie axonale géante (OMIM #256850) qui est une maladie très similaire à NSMH/ACC (Bomont et al. 2000, kuhlenbaumer et al. 2002). L'axonopathie géante touche progressivement le système nerveux central et le système nerveux périphérique, cause du retard mental, une réduction du potentiel d'action sensoriel et une atteinte motrice générale (Mahadevan et al. 2000). Il a été montré que la gigaxonine joue un rôle important dans les interactions entre les filaments intermédiaires cytoplasmiques et les réseaux de microtubules, en particulier via la protéine MAP1B, dont elle régule la dégradation (Allen et al. 2005). Ces défauts de dégradation sont directement à l'origine des effets délétères des mutations de GAN1. Bien que l'accumulation de neurofilaments – un aspect clef de l'axonopathie géante – est inexistante dans NSMH/ACC, les deux maladies ont en commun un mécanisme pathologique majeur qui se traduit par l'affinement de la gaine de myéline associé à du gonflement axonal (Labrisseau et al. 1984).

En général, les formes axonales autosomiques récessives de NSMH sont causées par des mutations qui affectent des protéines avec des fonctions très hétérogènes. Par exemple

vont être altérés des composants de la membrane nucléaire (*e.g.* la lamine A LMNA; OMIM #605588), des enzymes telles que la topoisomerase TDP1 qui maintient l'intégrité génétique dans les neurones post-mitotiques (OMIM #607250), l'aprataxine (APTX), une di-adénosine polyphosphate hydrolase (OMIM #208920) ou la senataxine (SETX), qui est une hélicase ADN/ARN (OMIM #606002). Du fait de cette grande hétérogénéité fonctionnelle, des mécanismes pathogéniques en commun à toutes ces maladies sont difficiles à établir dans ce sous-groupe.

1.2.5 Les formes liées au chromosome X

Les formes liées au chromosome X ont à la fois des aspects démyélinisants et axonaux. C'est le cas des désordres causés par des mutations dans le gène codant la connexin-32 (CX32) dont la fonction dans le système nerveux est de former des jonctions gap intercellulaires qui permettent de connecter les repliements cytoplasmiques des cellules de Schwann et participe au transfert de nutriments et d'ions jusqu'aux couches de myéline les plus profondes (kleopa et al. 2002).

Tableau II

Sous-types de neuropathies sensitives et motrices héréditaires (NSMH) et les protéines mutées qui y sont associées.

Name	Alias	Protéine	Type	Transmission
NSMH IA	CMT1A	PMP22	Démyélinisante	Autosomique dominante
NSMH IB	CMT1B	MPZ	Démyélinisante	Autosomique dominante
NSMH IC	CMT1C	SIMPLE/LITAF	Démyélinisante	Autosomique dominante
NSMH ID	CMT1D	EGR2	Démyélinisante	Autosomique dominante
NSMH IE	CMT1E	PMP22	Démyélinisante	Autosomique dominante
NSMH IF	CMT1F	NEFL	Démyélinisante	Autosomique dominante
NSMH IIA1	CMT2A1	KIF1B	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIA2	CMT2A2	MFN2	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIB	CMT2B	RAB7	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIB1	CMT2B1	LMNA	Axonale	Autosomique récessive
NSMH IIB2	CMT2B2		Axonale	Autosomique récessive
NSMH IIC	CMT2C		Axonale	Autosomique dominante
NSMH IID	CMT2D	GARS	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIE	CMT2E	NEFL	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIF	CMT2F	HSPB1	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIG	CMT2G	GDAP1	Axonale	Autosomique récessive
NSMH IIH	CMT2H		Axonale	Autosomique récessive
NSMH III	CMT2I	MPZ	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIJ	CMT2J	MPZ	Axonale	Autosomique dominante
NSMH IIK	CMT2K	GDAP1	Axonale	Autosomique récessive
NSMH IIL	CMT2L	HSPB8	Axonale	Autosomique dominante
NSMH III	CMT3	MPZ	Démyélinisante	Autosomique dominante ou récessive
		PMP22		
		PRX		
		EGR2		

		GJB1		
NSMH IVA	CMT4A	GDAP1	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH IVB1	CMT4B1	MTMR2	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH IVB2	CMT4B2	SBF2	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH IVC	CMT4C	SH3CT2	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH IVD	CMT4D	NDRG1	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH IVE	CMT4E	EGR2	hypomyélinisante	Autosomique dominante et récessive
		MPZ		
NSMH IVF	CMT4F	PRX	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMHR	CMT4G		Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH IVH	CMT4H	FGD4	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH IVJ	CMT4J	FIG4	Démyélinisante	Autosomique récessive
NSMH V	CMT/aspect pyramidal			Autosomique dominante
NSMH VI	CMT6	MFN2	Démyélinisante	Autosomique dominante
NSMH X	CMTX1	GJB1	Démyélinisante et axonale	Liée à l'X
	CMTX2		Démyélinisante et axonale	Liée à l'X
	CMTX3		Démyélinisante et axonale	Liée à l'X
NAMSD	CMTX4			Liée à l'X
	CMTX5	PRPS1		Liée à l'X

2. La NSMH/ACC

2.1 Nomenclature

L'appellation de neuropathie sensitive et motrice héréditaire avec agénésie du corps calleux (NSMH/ACC; OMIM #218000) est la terminologie la plus informative et qui de plus rattache la maladie à la famille des neuropathies sensibles et motrices héréditaires (NSMH) (voir *paragraphe 1.2 de l'Introduction* pour une revue des NSMH). Cependant, on retrouve aussi dans la littérature l'appellation d'agénésie du corps calleux avec neuropathie périphérique (ACCPN); il s'agit d'une dénomination trompeuse, étant donné que l'aspect clef de la maladie est la neuropathie périphérique et non l'agénésie du corps calleux (Mathieu et al. 1990). La dénomination de "syndrome Andermann" est aussi fréquemment utilisée et vient du fait que la première caractérisation détaillée de la maladie a été établie par les docteurs Frederick et Eva Andermann (Andermann et al. 1972, Andermann et al. 1979, Andermann et al. 1981). Enfin, l'appellation la moins rencontrée est "maladie de Charlevoix" qui s'apparente au fait que la plus haute prévalence de la maladie se trouve dans le comté de Charlevoix au Québec (Larbrisseau et al. 1984).

2.2 Historique

- 1955** Premier cas Canadien Français rapporté dans la littérature scientifique (Naiman and Fraser, 1955).
- 1966** Première description générale de la condition NSMH/ACC (Leblanc et al. 1966).
- 1972** Caractérisation clinique détaillée à partir d'une cohorte NSMH/ACC (Andermann et al. 1972).

- 1984** Description des dysmorphies faciales et de l'évolution progressive de la maladie (Larbrisseau et al. 1984).
- 1993** Cas hors Québec signalé dans la littérature scientifique (Hauser et al. 1993).
- 1999** Clonage et caractérisation moléculaire de KCC3 (Hiki et al. 1999, Mount et al. 1999, Race et al. 1999).
- 2002** Identification de mutations dans le gène *KCC3* causant NSMH/ACC (Howard et al. 2002).
Premier modèle murin knock-out *Kcc3* (Howard et al. 2002).
- 2003** Second modèle murin knock-out *Kcc3* (Boettger et al. 2003).
- 2008** Autre modèle, maladie neuromusculaire chez la souris *gaxp* porteuse d'une délétion dans la séquence codante du gène *Kcc3* (Jiao et al. 2008).

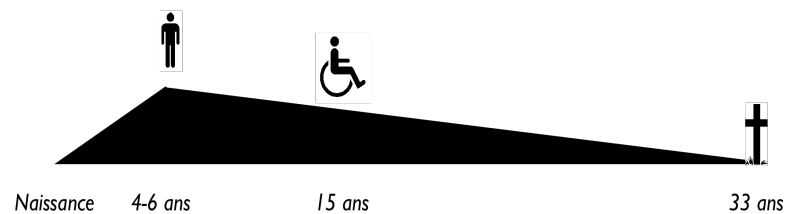
2.3 Diagnostique et prise en charge

2.3.1 Aspects cliniques

Une fois qu'il est établi qu'il s'agit d'une neuropathie (voir la *paragraphe 1.1* de cette *Introduction* pour avoir une idée de la liste des critères), une des toutes premières étapes du diagnostique de la NSMH/ACC est de déterminer par imagerie si il y a ou pas des anomalies de développement du corps calleux (*via* IRM ou CAT scan du cerveau) (Mathieu et al. 1990). Cependant, bon nombre de neuropathies se traduisent par des corps calleux absents ou incomplets (voir plus loin *paragraphe 5* de ce chapitre d'*Introduction*). Ainsi, des aspects cliniques complémentaires sont requis pour diagnostiquer de façon certaine la maladie.

Les individus ont systématiquement un retard de développement moteur (acquisition de la marche vers 4–6 ans) et un retard dans leurs aptitudes cognitives et d'apprentissage (Andermann et al. 1981, Labrisseau et al. 1984, Mathieu et al. 1990). Par la suite, l'évolution de la maladie est progressive et sévère (**Figure 1**) (Andermann et al. 1979). Mais là encore ces traits se retrouvent dans de nombreuses neuropathies et c'est pourquoi des critères physiques sont également à prendre en compte par le médecin pour parvenir à un diagnostic définitif.

Figure 1.
Évolution de la NSMH/ACC



Classiquement, la tête des individus est allongée et asymétrique (brachycéphalie) avec un développement incomplet de la mâchoire supérieure (maxillaire hypoplasique). Ils ont également un menton proéminent, un front étroit, une ligne capillaire basse et de larges oreilles. Au niveau des yeux, il y a une augmentation de l'espace entre les orbites oculaires (hypertélorisme), ainsi qu'une chute de la paupière supérieure (blepharoptosis) et une perte des réflexes autour de l'œil dû à une diminution de tissu nerveux autour de l'œil (observation de biopsie). Au niveau de la bouche, le palais est souvent hautement arqué et les individus ont constamment la bouche ouverte du fait d'une langue protubérante. Enfin,

au niveau des membres, les doigts sont longs avec des jointures contractées et les pouces sont placés plus bas que la normale. Parfois les orteils sont ‘en marteau’ du fait d’une contracture permanente similaire à ce qui se produit avec les mains. Il arrive parfois aussi qu’il y ait une syndactylie correspondant à la fusion des doigts de pieds en un seul orteil. Les patients présentent de temps en temps une déviation ulnéaire qui peut mener à la perte de fonction de leurs bras (Andermann et al. 1984, Mathieu et al. 1990, Labrisseau et al. 1984).

L’atteinte musculaire se manifeste dès la naissance du fait d’une réduction de la tonicité des muscles squelettiques (hypotonie). Ceci conduit à une faiblesse générale et ultimement à de l’invalidité autour de l’adolescence. Cette condition semble être liée à une diminution de la résistance des muscles aux étirements passifs (Andermann et al. 1984).

D’un point de vue électrophysiologique, la vitesse de conduction des nerfs moteurs est moyennement réduite (30–40 m/s). Les études réalisées montrent, par contre, qu’il n’existe pas de potentiel d’action sensoriel (Labrisseau et al. 1984, Dupré et al. 2003).

D’un point de vue cognitif et psychiatrique, il existe un retard mental qui est modéré à moyen (Mathieu et al. 1990). Les individus qui souffrent du syndrome sont aussi plus fréquemment atteints de psychose que la population générale. Cette psychose se manifeste par des hallucinations auditives et visuelles qui débutent généralement à la maturité (vers 20–25 ans) et mène parfois à la mort (Filteau et al. 1991).

2.3.2 Prévention

Pour un couple considéré à risque qui attend un enfant, s’il y a un historique de syndrome NSMH/ACC dans les deux familles, une échographie du bébé en développement peut être réalisée lors d’un diagnostique prénatal. Cependant, celle-ci ne peut être réalisée que lorsque le cerveau du fœtus est totalement développé, c’est à dire en milieu de grossesse (après 20 semaines de gestation).

Désormais, l'identification du gène responsable de la maladie a ouvert le champ des approches diagnostiques mais aussi préventives. Il existe la possibilité de prédire à une personne porteuse de l'allèle muté qui est asymptomatique (individu hétérozygote) qu'il est à risque de concevoir un enfant atteint de la NSMH/ACC. Ceci permet de bénéficier d'un suivi encore plus spécialisé. De même, si la conception est envisagée chez un couple hautement à risque où tous les deux sont porteurs de mutations, il reste l'option d'une analyse pré-implantatoire de l'embryon pour diminuer les risques de concevoir un enfant atteint de la maladie.

2.3.3 Traitement

La NSMH/ACC est extrêmement difficile à gérer et il n'y a virtuellement aucun traitement qui donne des résultats positifs.

Le retard mental de cette maladie ne peut pas être traité, c'est pourquoi les praticiens s'efforcent de gérer les symptômes de manière similaire à d'autres maladies qui comportent des problèmes d'apprentissage (MCW Healthlink, 1999).

Le retard moteur est tout aussi difficile à traiter. Certains médecins prescrivent la chirurgie pour redresser la scoliose, mais même après chirurgie l'individu finit sa vie en fauteuil roulant (Comeau et al. 1996). Une autre option préconisée est une physiothérapie continue pour maintenir la tonicité musculaire et empêcher l'atrophie.

Des traitements alternatifs ont été proposés, dont les suppléments en co-enzymes et vitamines chez les individus atteints, mais jusqu'à présent ceux-ci n'ont pas eu de succès sur la NSMH/ACC (Matthews et al. 1993).

C'est pourquoi la détection des mutations dans le gène *KCC3* chez les malades est très importante pour l'adoption d'une approche de gestion de la maladie. De plus, la caractérisation des mécanismes qui mènent à la pathogenèse de la NSMH/ACC est une

étape indispensable pour aller vers un traitement adéquat et une meilleure gestion des patients.

3. La famille SLC12

3.1 Généralités

Les variations d'osmolarité du milieu environnant, c'est-à-dire suite aux changements de concentration en particules qui ne peuvent pas traverser librement la membrane cellulaire, produisent des flux d'eau qui influencent le volume cellulaire. La cellule a donc développé une série de mécanismes de transports ioniques pour palier à ces variations délétères de volume. En effet, des volumes cellulaires extrêmes peuvent conduire à des dommages irréversibles liés à des pressions mécaniques trop intenses sur les membranes ou à la dilution ou sur-concentration des éléments cytosoliques nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. En réponse à un gonflement ou un rétrécissement cellulaire, des ions et des osmolites sont transportés de façon active ou passive par des canaux ou des transporteurs afin de permettre un flux simultané d'eau (**Figure 2**).

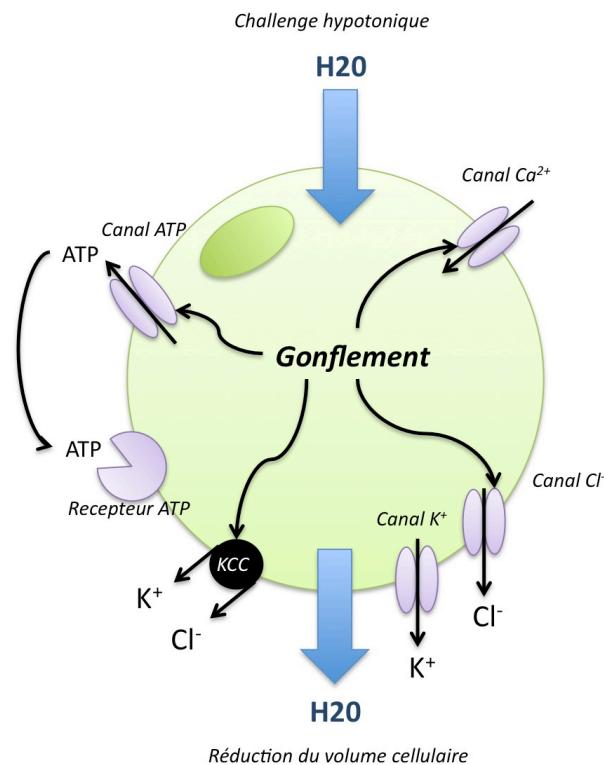
Le co-transporteur de potassium-chlore 3 (KCC3) est un acteur de la réduction du volume cellulaire (RVC). Il est de ce fait activé par le gonflement causé par un excès d'eau intracellulaire, ou conditions « hypotoniques ». KCC3 fait partie d'une famille de co-transporteurs appelée SLC12 (solute carrier family 12), qui regroupe des protéines impliquées dans le transport électroneutre de chlore, de potassium et/ou de sodium à travers la membrane plasmique. Cette famille fait, elle-même, partie d'une autre grande famille de protéines qui inclut tous les transporteurs d'acide aminé-polyamine-organocations. Les SLC12 sont tous des symporteurs, c'est-à-dire que tous les ions sont transportés à travers la membrane dans une même direction et ce processus est électroneutre, c'est-à-dire que la charge nette des ions transportés est nulle. Une revue des membres de la famille SLC12

avec une emphase sur leur rôle dans le système nerveux est introduite ici (voir aussi Hebert et al. 2003).

Il est important de noter que, dans le système nerveux central (SNC), la régulation intracellulaire de chlore joue un rôle important dans la détermination du type et de l'amplitude de la réponse à certains neurotransmetteurs, ce qui donne aux SLC12 du système nerveux un rôle fondamental dans la régulation de l'excitation nerveuse.

Figure 2.

Représentation schématique des transporteurs et canaux ioniques activés par le gonflement cellulaire (d'après Okada et al. *J Physiol*, 2001)



3.2 Les co-transporteurs de chlore couplé au sodium

Les protéines qui couplent le co-transport électroneutre de chlore et de sodium ont une structure de base commune composée d'un centre hydrophobe à 12 domaines transmembranaires, une boucle hydrophile extracellulaire glycosylée qui connecte les segments 7 et 8, un court domaine N-terminal cytosolique et un grand domaine C-terminal cytosolique. Les NCC et NKCC sont généralement activés par des conditions hypertoniques, c'est-à-dire lorsque la concentration en ions et en osmolites hors de la cellule est supérieure à la concentration intracellulaire. Cela permet un import des ions Na^+ et Cl^- dans la cellule et participe à l'augmentation du volume de la cellule (AVC) à la suite d'un rétrécissement cellulaire (Hebert et al. 2003, Haas et al. 1998).

3.2.1 NCC

Le co-transporteur de sodium-chlore sensible au thiazide a été le premier co-transporteur électroneutre identifié à l'échelle moléculaire (Gamba et al. 1993). NCC, aussi connu sous le nom de SLC12A3 ou TSC, est un acteur principal de la voie de réabsorption du sodium du cortex rénal. Il est exclusif au rein et aucune expression n'a été rapportée dans le système nerveux (Chang et al. 1996).

Son rôle fondamental est de préserver dans le rein le volume du fluide extracellulaire et l'homéostasie des cations divalents. Ces fonctions ont été établies fermement par l'identification de mutations inactivatrices dans le gène codant pour NCC dans le syndrome de Gitelman (voir aussi *paragraphe 4.2.1* de ce chapitre d'*Introduction* pour des compléments d'information sur le syndrome de Gitelman).

La maladie de Gitelman est un désordre autosomique récessif qui s'accompagne d'une augmentation de l'alcalinité sanguine liée à un faible taux de potassium dans le sang (alcalose hypokaliémique), d'une faible concentration de calcium dans les urines (hypocalciurie) et d'une faible concentration en magnésium dans le sang (hypomanganésémie) (Delpire et al. 2002).

L'invalidation homozygote chez la souris de *Slc12a3* mène, elle aussi, à des défauts d'homéostasie en magnésium et en calcium (Schultheis et al. 1998). Cependant, il faut noter que chez la souris comme chez l'humain les concentrations en sodium et le volume total de fluide ne semblent que moyennement affectés (Pathak et al. 1996).

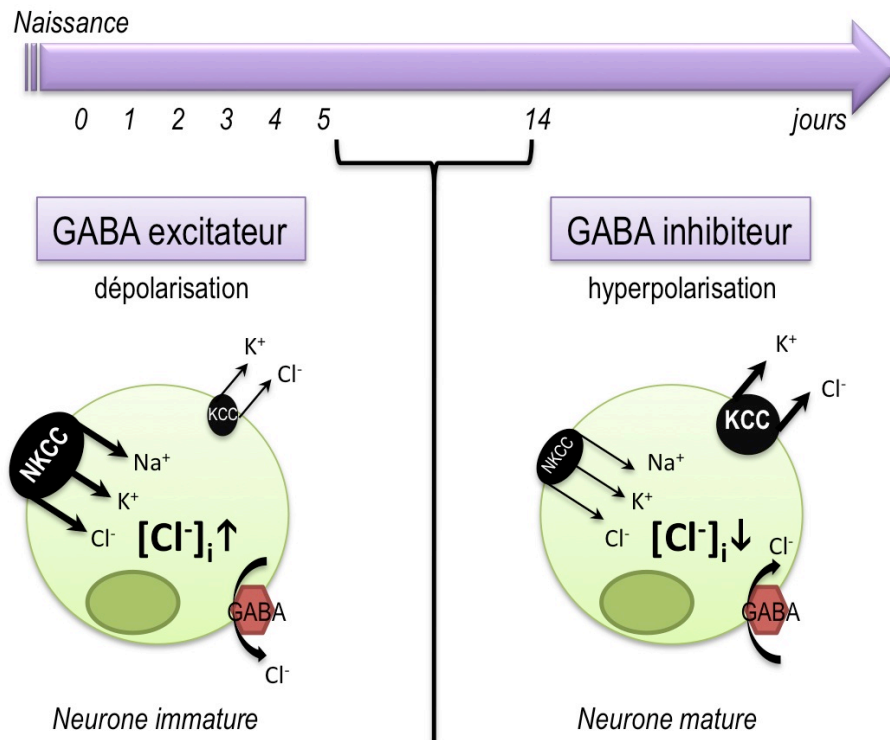
3.2.2 NKCC1

Le co-transporteur de sodium-potassium-chlore 1 sensible à la bumétamide, parfois aussi appelé SLC12A2 ou BSC2, est le plus souvent référé sous le nom de co-transporteur sécrétoire Na-K-2Cl du fait de son expression dans de nombreux épithéliums sécrétoires.

C'est dans le système nerveux et dans le rein que les études d'expression de *NKCC1* ont été les plus poussées (Xu et al. 1994, Dzhala et al. 2005). Dans le cerveau, le co-transporteur est hautement exprimé, en particulier au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales du plexus choroïdien, mais aussi dans les jeunes neurones et les oligodendrocytes.

L'association de NKCC1 avec la croissance axonale (Nakajima et al. 2007) et son implication dans l'épilepsie font l'objet de beaucoup d'attention. Il a été proposé que, au cours du développement des neurones corticaux, l'expression trop élevée de NKCC1 résulterait en une forte concentration intracellulaire en chlore (Alvarez-Leefmans et al. 2001). En conséquence, l'activation des récepteurs GABA qui conduit à l'extrusion de chlore mène à une dépolarisation du potentiel de membrane et donne des activités épileptiques dans le système nerveux immature (Dzhala et al. 2005). NKCC1 semble donc avoir un rôle très important dans les neurones primaires du fait de son rôle dans l'inhibition (**Figure 3**).

Figure 3.
Lien entre la maturation neuronale, le type de réponse au GABA et l'activité des co-transporteurs électroneutres (d'après Gamba 2005)



Chez l'homme, il a d'ailleurs été montré que l'altération de l'homéostasie de chlore causé par un fonctionnement anormal de ce co-transporteur donne une hypoexcitabilité neuronale et module la susceptibilité aux crises d'épilepsie ou aux douleurs neuropathiques (douleur spontanée qui s'exprime en dehors de toute stimulation) (Delpire et al. 2002).

Les modèles murins *Nkcc1*^{-/-} ont, notamment, une diminution de la nociception (sensibilité à la douleur) et le phénotype le plus marquant est « shaker/waltzer », qui se caractérise par un animal qui tourne en rond en dodelinant de la tête (Delpire et al. 1999, Dixon et al. 1999, Evans et al. 2000).

3.2.3 NKCC2

Le co-transporteur de sodium-potassium-chlore 2 est lui aussi sensible à la bumétamide. NKCC2 ou SLC12A1 est le co-transporteur Na-K-2Cl « absorptif », car il correspond au transporteur apical qui réabsorbe les ions Na⁺, K⁺ et Cl⁻ de l'ultrafiltrat glomérulaire lorsque celui-ci passe au travers de l'anse ascendante rénal (Hebert et al. 2003).

Contrairement à NKCC1, l'expression de NKCC2 se limite au rein où il est crucial pour la ré-absorption des cations, la sécrétion acide et la multiplication du contre-courant rénal.

Les mutations dans le gène codant NKCC2 mènent à la maladie de Bartter. Le syndrome de Bartter est une forme autosomique récessive d'alcalose métabolique hypokaliémique et hypochlorémique (faible taux sanguin en chlore) et souligne le rôle prééminent de NKCC2 dans la physiologie rénale (voir aussi *paragraphe 4.2.2* de ce chapitre d'*Introduction* pour des compléments d'information sur la maladie de Bartter) (Simon et al. 1996).

Les souris *Nkcc2*^{-/-} sont particulièrement déshydratées, présentent une insuffisance rénale, une acidose métabolique, un excès d'urine dans les reins (hydronéphrose) et un haut taux de potassium et de rénine plasmique (Takahashi et al. 2000).

3.3 Les co-transporteurs de chlore couplé au potassium

Les co-transporteurs de potassium-chlore (KCCs) partagent une structure putative commune de 12 domaines transmembranaires reliés par une boucle hydrophile glycosylée entre les segments 5 et 6. Ce corps hydrophobe est flanqué d'un domaine amino-terminal variable et d'un domaine carboxy-terminal relativement constant (Mount et al. 1999). Fondamentalement, ces protéines permettent le co-transport d'ions potassium et chlore hors de la cellule et sont de ce fait des acteurs importants de la diminution du volume en réponse à un gonflement cellulaire. Les KCCs fonctionnent généralement dans des conditions hypotoniques, c'est-à-dire lorsque la concentration en ions et en osmolites hors de la cellule est inférieure à la concentration intracellulaire (Mount et al. 1998, Lauf et al. 2000). Cependant, il existe un KCC (KCC2) exprimé dans le système nerveux et dont l'activation n'est pas osmo-dépendante. Il s'agit des protéines qui sont le plus apparentées à KCC3, le co-transporteur qui est muté dans la NSMH/ACC.

3.3.1 KCC1

KCC1 ou SLC12A4 fut le premier KCC à être cloné et caractérisé. Il est exprimé de façon ubiquitaire et se retrouve donc dans le système nerveux périphérique et le système nerveux central (Gillen et al. 1996). Cependant, ce profil d'expression généralisé suggère une activité de ménage et non pas un rôle spécifique de KCC1 dans les systèmes nerveux.

Les souris *Kcc1*^{-/-} sont viables et fertiles, normales en apparence et, en particulier, ne montrent aucun déficit moteur ou de variation de susceptibilité aux crises d'épilepsie. On peut suspecter que cette absence totale de phénotype est liée à une forte redondance fonctionnelle avec KCC3, puisque la double invalidation *Kcc1*^{-/-} *Kcc3*^{-/-} donne un phénotype plus sévère que les simples KO, en particulier au niveau des cellules sanguines (Rust et al. 2007).

3.3.2 KCC2

KCC2 ou SLC12A5 est fortement exprimée dans le cerveau, uniquement dans les neurones. L'expression neuronale semble se limiter au système nerveux central à l'exception peut-être de certains nerfs sensoriels issus du ganglion de l'épine dorsale (DRG) (Payne et al. 1996).

En conjonction avec NKCC1, KCC2 est importante dans la détermination du type et de l'amplitude de la réponse à certains neurotransmetteurs (glycine et GABA), pendant le développement et la maturation neuronale (Stein et al. 2003). Dans les neurones matures du système nerveux central la fixation de GABA à son récepteur GABA-A ouvre les canaux chlore-dépendants. Ceci permet l'entrée de chlore qui produit la dépolarisation membranaire. Ainsi, chez les animaux adultes, GABA a un effet d'inhibition sur l'excitabilité neuronale. Par contre, dans les stades précoces du développement neuronal, l'association de GABA à son récepteur GABA-A produit de la repolarisation. Il existe beaucoup d'évidences qui suggèrent que KCC2 régule la concentration intracellulaire en chlore, ce qui expliquerait les différences périnatales de réponse au GABA (**Figure 3**). Il a aussi été montré que KCC2 est fondamentale pour le développement normal du système nerveux central. étant donné son rôle antagoniste à NKCC1 dans le système nerveux en développement (Owens et al. 2002, Stein et al. 2003).

L'importance de KCC2 dans la régulation de l'excitabilité du système nerveux central a été établie par la caractérisation de souris mutée pour le gène *Kcc2*. L'inactivation homozygote du gène chez la souris cause des problèmes respiratoires en raison de sévères déficiences motrices, ce qui mène à la mort dès la naissance. De plus, des souris homozygotes pour l'inactivation hypomorphe du gène *Kcc2* présentent de fréquentes crises d'épilepsie, alors que les hétérozygotes ont une plus grande susceptibilité aux crises (Hubner et al. 2001).

3.3.3 KCC3

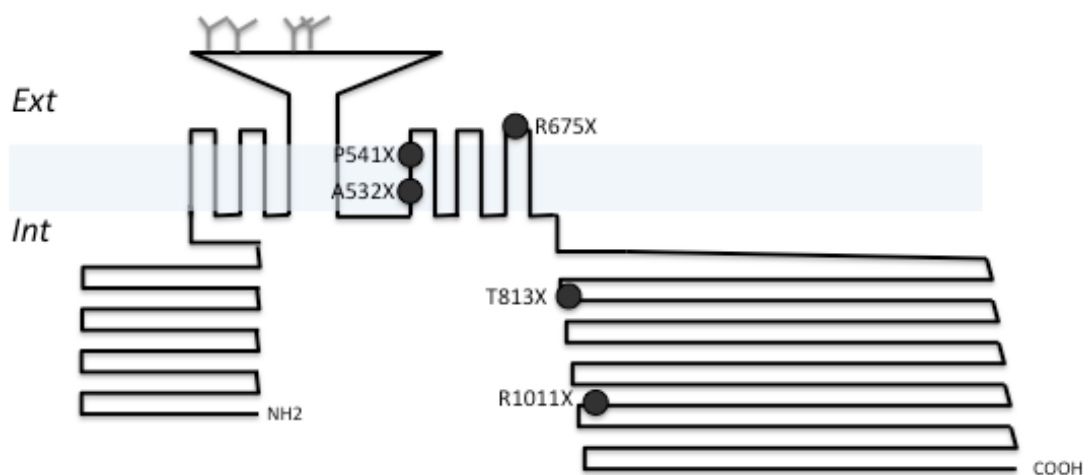
KCC3 ou SLC12A6 est le troisième membre de la famille des KCC et une description détaillée est trouvée dans l'*Article 4* de cette thèse (structure, fonction, expression, maladies du système nerveux auxquelles il a été associé et invalidation chez la souris).

Brièvement, KCC3 est un co-transporteur dont l'expression est quasi ubiquitaire avec cependant un enrichissement important dans le système nerveux.

Les mutations qui se produisent dans le gène *KCC3* chez l'humain donnent la NSMH/ACC (**Figure 4**). Ces mutations conduisent généralement à la perte de fragments en C-terminus et à la perte de fonction du co-transporteur (**Figure 2**). Chez la souris, l'inactivation du gène *Kcc3* donne une neuropathie similaire à celle retrouvée chez l'humain ce qui souligne le rôle prépondérant de KCC3 dans la maintenance de l'intégrité du système nerveux.

Figure 4

Structure globale de KCC3 et mutations NSMH/ACC connues en 2004



3.3.4 KCC4

KCC4 ou SLC12A7 est exprimée de façon prédominante dans le rein, le coeur, les poumons et le foie mais peu d'expression a été remarquée dans le cerveau (Mount et al. 1999).

Les souris *Kcc4*^{-/-} ont une rapide détérioration de l'ouïe (surdité) et une acidose rénale qui suggère que KCC4 participe au recyclage du potassium (Boettger et al. 2002).

3.4 Membres orphelins

3.4.1 CIP

CIP (cation-chloride co-transporter-interacting protein) ou SLC12A9 est le premier interacteur hétérologue de CCC à avoir été identifié (Caron et al. 2000). Il semblerait que l'une des caractéristiques de CIP est de moduler l'activité d'autres co-transporteurs de cation-chlore. Notamment, CIP1 est capable d'activer KCC2 dans les neurones du système nerveux central en formant des structures hétérodimériques (Wenz et al. 2009).

3.4.2 CCC9

CCC9 ou SLC12A8 est un membre très atypique de cette famille, puisqu'il a été montré qu'il permet de promouvoir le transport de polyamines et d'acides aminés à la surface de cellules en culture (Daigle et al. 2009). *SLC12A8* a également été identifié comme un gène de susceptibilité pour le *psoriasis vulgaris*, une maladie chronique inflammatoire de la peau pour laquelle on suspecte des facteurs de risque génétiques et environnementaux (Huffmeier et al. 2005). Il s'agit de plus du membre le plus distant de la famille SLC12, parce qu'il ne compte que 11 domaines transmembranaires et que son domaine carboxy-terminal est localisé hors de la cellule.

Tableau III.

Fonction, maladies associées et modèles animaux des membres de la famille SLC12 de co-transporteurs

Symbole	Référence	Alias	Fonction	Maladie associée	Modèle animal
SLC12A1	NM_000338	NKCC2	Réabsorption de Na ⁺ et Cl ⁻ dans le rein.	Syndrome de Bartter	Modèle murin au phénotype identique à l'homme
SLC12A2	NM_001046	NKCC1, BSC	Mouvement transcellulaire de Cl ⁻ à travers les épithéliums sécrétoires et absorbatifs. Développement du système nerveux.		Surdité, défaut de salivation, résistance aux infections pulmonaires.
SLC12A3	NM_000339	NCCT, TSC	Réabsorption de Na ⁺ et Cl ⁻ dans le rein.	Syndrome de Gitelman	Modèle murin au phénotype identique à l'humain.
SLC12A4	NM_005072	KCC1	Transport transmembranaire ubiquitaire de K ⁺ et de Cl ⁻ .		
SLC12A5	NM_020708	KCC2	Export de Cl ⁻ pour la rapide inhibition post-synaptique hyperpolarisante dans le cerveau.		Sévères déficits moteurs.
SLC12A6	NM_005135	KCC3	Efflux de Cl ⁻ et de K ⁺ pour la réduction du volume cellulaire.	NSMH/AC C	Similaire à l'humain, excepté que l'agénésie du corps calleux est absente.
SLC12A7	NM_006598	KCC4	Recyclage de K ⁺ .		Surdité et acidose rénale.
SLC12A8	NM_024628	CCC9	Transport de polyamines et d'acides aminés.	Psoriasis	
SLC12A9	NM_020246	CIP	Modulation de l'activité des CCCs		

4. Mécanismes d'inactivation des CCCs

4.1 Généralités

Il existe au moins cinq mécanismes pathologiques qui mènent à la réduction de l'activité d'un transporteur ou à sa perte de fonction (**Figure 5**). Il a déjà été montré que certains d'entre eux sont à l'origine de l'inactivation de co-transporteurs de la famille SLC12 dans des maladies humaines. Cependant, les processus mécanistiques ont surtout été étudiés pour des canaux ioniques différents, tels que le canal chlore CFTR dont les mutations sont à l'origine de la fibrose kystique (OMIM #219700), ou encore pour des transporteurs de grosses molécules, tels que SLC5A1 qui transporte du galactose et du glucose et dont les mutations sont à l'origine de malabsorption de monosaccharides (OMIM #606824). Le fait que ce soit de grosses protéines transmembranaires sujetes au même processus de maturation protéique que les SLC12 en fait des références idéales pour comprendre ce qui est à l'origine de l'inactivation des CCCs.

4.1.1 Catégorie 1 : Défaut de la synthèse protéique.

Un codon stop localisé avant la fin de la séquence complète du gène est généralement reconnu par des endo- et exo-nucléases faisant partie de la machinerie de dégradation des ARNs. Ce processus est activé en l'absence de la configuration stéréotypée de séquence de l'ARN qui comprend, entre autres, le signal de polyadénylation impliqué dans la protection en 3' (le 'capping' de l'ARN). C'est pourquoi il a été fréquemment observé que des mutations introduisant un codon stop prématuré par mutation ponctuelle, décalage du cadre de lecture ou élimination de sites d'épissage donnent des défauts de synthèse de la protéine mutée.

De tels défauts peuvent se démontrer de manière expérimentale lorsqu'on constate que l'ARN muté est indétectable ou sérieusement diminué comparé à des ARNs contrôle et qu'en conséquence la protéine mutée est totalement absente en immuno-blot.

4.1.2 Catégorie 2 : Défaut de la maturation protéique.

La maturation se fait d'abord avec le support des protéines chaperonnes du réticulum endoplasmique qui ajustent la protéine nouvellement synthétisée dans sa bonne conformation tri-dimensionnelle. Cela passe aussi par des processus de glycosilation qui ont d'abord lieu dans le réticulum endoplasmique (N-glycosylation) puis dans l'appareil de Golgi (N- et O-glycosylation). En théorie, ce profil de glycosylation correspond à une signature qui indique la 'résidence' subcellulaire de la protéine (*e.g.* RE, lysosome, membrane plasmique, etc). Il s'agit, de plus, d'un indice de l'intégrité de la protéine nouvellement synthétisée. L'absence de glycosylation est de ce fait le signal qui peut empêcher la protéine aberrante de transiter jusqu'à sa destination finale en la retenant via des chaperonines dans un compartiment cellulaire.

Ces défauts de glycosylation s'observent, par exemple, lorsque le poids moléculaire de la protéine mutée est anormalement bas en immunoblot.

4.1.3 Catégorie 3 : Défaut d'insertion dans la membrane plasmique d'un transporteur qui est fonctionnel.

Pour qu'un transporteur soit adressé proprement à la membrane plasmique, cela nécessite un transit stéréotypé vers la surface de la cellule en passant par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules de transport. En cas d'anomalie, la protéine mutée peut être retenue dans le réticulum endoplasmique, dans l'appareil de Golgi (*c.f.* **catégorie 2**) ou dans des vésicules d'exocytose ce qui empêche sa livraison à la membrane plasmique. Les protéines aberrantes qui ne s'insèrent pas à la membrane sont ainsi maintenues à une localisation périnucléaire ou submembranaire sans jamais se rendre à la surface de la cellule.

En pratique, ce défaut peut se détecter sur Western-blot, lorsque la protéine mutée n'est pas ou peu représentée dans les extraits protéiques inclus dans des fractions purifiées de membrane plasmique.

4.1.4 Catégorie 4 : Défaut des propriétés fonctionnelles du co-transporteur.

Les propriétés fonctionnelles d'un transporteur dépendent de l'intégrité de la protéine, c'est-à-dire de sa bonne conformation mais aussi de la présence de domaines qui participent à sa régulation et à sa fonction. Ainsi, un co-transporteur dont la conformation est totalement aberrante ou auquel il manque un domaine fonctionnel (*e.g.* domaine de fixation aux ions ou site d'interaction avec une protéine régulatrice) ne pourra pas exécuter sa fonction même lorsqu'il est correctement inséré dans la membrane plasmique.

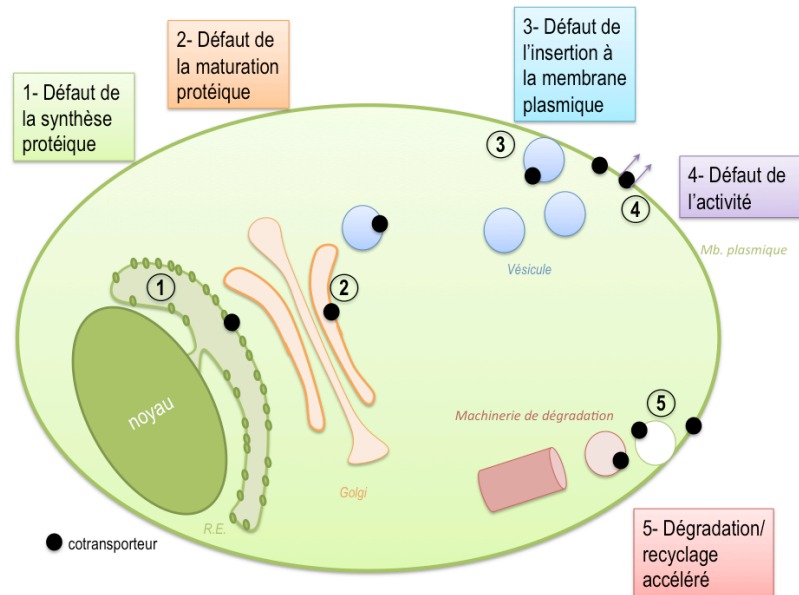
L'expression hétérologue des transporteurs mutée dans les ovocytes de Xénope est l'outil idéal pour réaliser des études purement fonctionnelles.

4.1.5 Catégorie 5 : Dégradation de la protéine ou son retrait accéléré de la membrane.

Le recyclage protéique est médié par les mécanismes cellulaires de dégradation des protéines. Ces mécanismes impliquent, entre autre, des séquences peptidiques signalant la durée de vie de la protéine, ce qui encadre son recyclage *via* les machineries de dégradation. Certaines mutations peuvent conduire à une précipitation de ce processus et à la dégradation accélérée de la protéine mutée.

Des défauts de ce type sont suspectés lorsque la durée de demi-vie de la protéine est sérieusement diminuée, ce qui se traduit également par une protéine instable qui est sous-représentée en immuno-blot.

Figure 5
Mécanismes d'inactivation de transporteurs d'ions (d'après Gamba 2005)



4.2 NCC

4.2.1 Génétique de la maladie de Gitelman

La maladie de Gitelman est transmise de façon autosomale récessive. Plus de 100 mutations à la localisation assez aléatoire ont été rapportées dans le gène *SLC12A3/NCC*. Plus des trois quarts sont des mutations ponctuelles faux-sens qui se produisent au niveau de résidus conservés entre espèces ou des mutations non-sens et des décalages du cadre de lecture qui tronquent la protéine. Une mutation sur 10 est une petite délétion alors qu'environ 7% des mutations affectent l'épissage. Enfin, le reste correspond à des petites insertions ou des insertion-délétions (indels) (Gamba et al. 2001).

4.2.2 Pathomécanismes connus

Bon nombre de mutations faux-sens qui se produisent dans le gène *SLC12A3/NCC* n'empêchent pas la synthèse de la protéine mais perturbent sa glycosylation et sa livraison à la membrane. Certaines de ces mutations faux-sens ont pour conséquence un co-transporteur non glycosylé à la maturation suffisamment normale dans les ovocytes de Xénope pour permettre d'en étudier la fonction. Ainsi la fonction et les propriétés cinétiques du co-transporteur dans les ovocytes de Xénope sont maintenues mais le défaut de glycosylation affecte partiellement l'insertion dans la membrane plasmique (Kunchaparty et al. 1999). Il semble donc que la glycosylation en soi n'est pas essentielle à la fonction de transport ionique. Ce type de mutations rentre dans la 3ème catégorie de mécanismes d'inactivation de transporteur d'ions (défauts d'insertion dans la membrane plasmique).

4.3 NKCC2

4.3.1 Génétique de la maladie de Bartter

La maladie de Bartter est autosomique récessive. Les mutations sont distribuées aléatoirement le long du gène *SLC12A1/NKCC2* et n'affectent pas une région ou un domaine en particulier de la protéine. Une vingtaine de mutations faux-sens ont été identifiées ainsi que cinq petites délétions qui conduisent à des protéines tronquées. Ainsi, la majorité des mutations rapportées sont des échanges ponctuels d'acides aminés, suivies de mutations tronquantes (codon stop ou décalage du cadre de lecture).

4.3.2 Pathomécanismes connus

Le niveau d'expression de certains mutants faux-sens (G193R, A267S, G319R, A508T, del526N et Y998X) est sévèrement réduit lorsque ces formes sont produites dans les ovocytes de Xénope (Starremans et al. 2003). Les trois premières sont correctement

glycosylées alors que les trois dernières ne le sont pas. Cependant, toutes se rendent au niveau de la membrane plasmique, ce qui suggère une fois de plus que l'état de glycosylation des co-transporteurs SLC12 n'est pas le meilleur indicateur fonctionnel. L'expression d'aucun de ces transporteurs ne donne lieu à des flux d'ions. Ce type de mutations rentre dans la 4ème catégorie des mécanismes d'inactivation des transporteurs d'ions, c'est-à-dire que les protéines mutées transitent et s'insèrent correctement dans la membrane plasmique mais il y a une perte de la fonction intrinsèque du co-transporteur.

4.4 KCC3

4.4.1 Génétique de la NSMH/ACC

Les mutations sont aléatoirement distribuées sur le gène *KCC3* mais affectent en particulier le domaine carboxy-terminal de la protéine. Au début de ce projet de doctorat, il existait cinq mutations connues qui mènent toutes ces mutations à l'élimination totale ou importante du C-terminus (voir **Figure 4** et **Tableau IV**). Ceci qui suggèrait fortement que la perte du domaine C-terminal était nécessaire pour mener aux manifestations de la maladie. Une liste complète des mutations identifiées à ce jour est aussi présentée dans l'*Article 4*.

Tableau IV.Mutations déjà identifiées dans le gène *KCC3* en 2004

Mutation	KCC3	Nature	Consequences	Mutant	Origin
1478_1485delTTCCCTCT	Exon 10	frameshift	Perte de TM7 à TM12 et 100% du C-terminus	A532X	Allemagne
1584_1585delCTinsG	Exon 11	frameshift	Perte de TM7 à TM12 et 100% du C-terminus	P541X	Canada
2023C→T	Exon 15	nonsense	Perte de TM12 et 100% du C-terminus	R675X	Italie
2436delG	Exon 18	splicing	Perte de 78% du C-terminus	T813X	Canada
3031C→T	Exon 22	nonsens	Perte de 32% du C-terminus	R1011X	Turquie

4.4.2 Pathomécanismes connus

Une petite insertion dans le site d'épissage de l'exon 18 dans la population québécoise donne une protéine tronquée (T813X) qui est normalement exprimée et maturée dans les ovocytes de Xénope. Cependant, tout comme les mutations qui affectent NKCC2, T813X n'induit pas de flux ionique même si la protéine est glycosylée et insérée dans la membrane plasmique (Howard et al. 2002). Cela suggère donc que ce sont les propriétés fonctionnelles du co-transporteur T813X qui font défaut (4^{ème} catégorie).

Cependant, seule cette mutation particulièrement fréquente au Québec a fait l'objet d'une étude fonctionnelle. C'est pourquoi, lors de ce projet, nous nous sommes intéressés à de nouvelles mutations qui pourraient permettre de récapituler un processus d'inactivation commun. Et en particulier, j'ai cherché à identifier d'autres mécanismes qui inactivent KCC3 en m'intéressant exclusivement à des mutations qui causent la NSMH/ACC.

5. Agénésie du corps calleux chez l'humain

5.1 Développement du corps calleux

Le corps calleux résulte de la fasciculation (la tendance qu'ont les neurites à croître le long des neurites préexistants) néocorticale des axones commissuraux. La première étape de développement consiste en la différenciation du neurone callosal à partir de la 5^{ème} semaine post-conception. C'est ce neurone qui donnera naissance au futur axone callosal; cette différenciation est un événement précoce qui se produit alors même que la migration neuronale est toujours en cours. Ensuite, la guidance de l'axone callosal vers sa cible spécifique est la seconde étape; cela inclut d'atteindre et de croiser la région médiane avant de former les premières synapses. Cette période, qui s'étend, chez l'humain, de la 12^{ème} à la 22^{ème} semaines post-conception, suit les étapes suivantes: (1) invasion progressive par le cône de croissance callosal à travers un chemin glial préconstitué; (2) apparition des trois parties du corps calleux: le tronc, le rostre et le splenium. Ces deux étapes sont contrôlées génétiquement, soit directement par des gènes de développement, soit indirectement par l'établissement de 'cartes' liées à l'expression spatiale de protéines de la matrice extracellulaire; (3) la troisième étape consiste en un remodelage par activité synaptique qui donne lieu à de l'élimination axonale. Celle-ci s'observe par un affinement transitoire du corps calleux. Cet événement périnatal contribue à ce que le corps calleux acquiert sa topographie mature (Schell-Apacik et al. 2008).

5.2 Agénésie du corps calleux

L'agénésie du corps calleux est une pathologie qui se définit par une absence totale ou partielle de corps calleux. Cette absence peut être isolée ou associée à d'autres

symptômes (**Tableau V**). Il faut cependant noter que l'agénésie du corps calleux, quelles qu'en soient la cause et la sévérité, s'observe dans 0,3 à 0,7 % de la population générale (Dobyns et al. 1996).

Tableau V.

Anomalies pouvant être à l'origine de l'agénésie du corps calleux.

Anomalies chromosomiques	Agents tératogènes	Infections	Anomalies métaboliques	Anomalies génétiques
Trisomie 13	Alcool	Rubéole	Hyperglycémie cétosique	non <i>Autosomal dominant</i>
Trisomie 18	Acide valproïque	Grippe	Syndrome de Zellweger	Dysplasie fronto-nasal
Trisomie 8	Cocaïne		Leucodystrophie	Syndrome de Miller-Dieker
			Syndrome de Menkes	<i>Autosomal récessif</i>
			Déficit en adrényl succinate	Syndrome acrocallosal
			Histidinémie	NSMH/ACC
			Déficit pyruvate kinase	Syndrome cérébro oculo facial
			Maladie de Leigh	Syndrome de Neu-Lavoxa
			Dysplasie cranio-telencephalique	Acidurie glutarique type II
				Hydrolethalus
				Syndrome d'Apert
				<i>Dominant lié à l'X</i>
				syndrome Oro-facio-digital type I
				Syndrome d'Aicardi
				<i>Récessif lié à l'X</i>
				Syndrome de Shapiro
				Dysplasie de Len
				Agénésie du corps calleux lié à l'X

Les agénésies totales du corps calleux sont détectées *in utero* lors des examens échographiques du cerveau foetal. L'agénésie partielle n'est absolument pas visible avant 18 semaines, voire le plus souvent avant 22 semaines, et est beaucoup plus difficile à

diagnostiquer. Un grand nombre d'épilepsies, retard de développement mental, manifestations psychotiques s'observent chez les enfants qui souffrent de cette anomalie mais bon nombre de ces enfants ont aussi un développement normal. Il n'existe aucun test ou examen qui permette de différencier les enfants qui auront un développement normal des autres. Le pronostic des agénésies partielles est tout aussi délicat; cependant, il semblerait que l'impact clinique de l'anomalie dépende de la localisation et de l'étendue de l'agénésie (Dobyns et al. 1996).

Objectifs du projet de thèse

Lorsque ce projet a débuté, il avait déjà été établi que cinq mutations tronquantes dans le gène *KCC3* (901delA, 1584_1585delCTinsG, 2023C→T, 2436delG, 3031C→T) pouvaient causer la maladie et débouchaient – dans le cas de la mutation Canadienne Française la plus commune – sur une perte de fonction du co-transporteur. Le principal but de ce projet était d'étendre ces connaissances et de comprendre comment les différentes mutations (connues ou nouvellement identifiées) affectaient la fonction de *KCC3*. Pour parvenir à cet objectif, nous avons proposé de suivre les étapes décrites ci-dessous:

1- Poursuivre l'identification de nouvelles mutations causantes par séquençage direct du gène *KCC3* et les caractériser fonctionnellement par expression hétérologue dans les ovocytes de Xénope (*Xenopus laevis*). Nous avons collecté des échantillons de sang provenant de patients recrutés à travers le monde et qui présentaient les traits classiques du syndrome NSMH/ACC. À l'aide d'amorces spécifiques, les 26 exons du gène *KCC3* ont été directement séquencés. Un de nos objectifs a été de répertorier de nouvelles mutations faux-sens, non-sens, des délétions ou des insertions dans les séquences codante ou flanquantes du gène. Il s'agissait ensuite d'évaluer leur impact fonctionnel en exprimant les co-transporteurs mutants dans les ovocytes de Xénope. Une attention particulière a été portée ici sur les mutations ayant un impact relativement limité sur la séquence peptidique (courtes troncations protéiques ou échange ponctuel d'acide aminé).

2- Identifier les partenaires protéiques qui interagissent avec le C-terminus de *KCC3* par des approches de biologie moléculaire. La plupart des mutations NSMH/ACC mènent à la perte de l'intégralité ou d'une portion du domaine C-terminal. Ainsi, il est possible que la perte de fonction de *KCC3* soit liée à la rupture d'interactions protéine–

protéine. À l'aide d'outils d'identification globale de partenaires protéiques, tels que la méthode double hybride et le pull-down, nous avons recherché des partenaires de KCC3. Nous nous sommes intéressés en particulier à un partenaire qui était déjà connu pour son interaction avec KCC2 et nous avons cherché à démontrer que ce partenaire interagissait également avec KCC3. La pertinence fonctionnelle de cette interaction a été recherchée à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de ce partenaire dans les ovocytes de Xénope.

3- Identifier les mécanismes à l'origine de l'inactivation de KCC3 en s'intéressant en particulier aux altérations à l'échelle cellulaire grâce à des approches immunologiques. L'étendue de la perte d'acides aminés en C-terminal est très variable d'une mutation tronquante à l'autre. De ce fait, l'impact sur l'intégrité protéique peut être minime à énorme. De plus, dans le courant de ce projet, Uyanik et al. puis Rudnik-Schöneborn et al. ont rapporté l'identification de mutations faux-sens dans le gène *KCC3* qui ne semble pas causer de troncation. Différents mécanismes peuvent être à l'origine de la perte de fonction de canaux et de transporteurs ioniques (se référer au *paragraphe 4* de ce chapitre d'*Introduction* pour un récapitulatif). À l'aide d'anticorps spécifiques alliés à la puissance de la technologie de la microscopie confocale, nous avons réalisé des études du transit des co-transporteurs KCC3 mutants à la membrane plasmique.

Les *Articles 1, 2 et 3* de cette thèse présentent les travaux complétés pour atteindre les buts décrits ci-dessus. Les identifications de nouvelles mutations faisant partie de l'objectif 1 ont été rapportées dans les *Articles 1 et 3*. L'*Article 2* répond à l'objectif 2; y est rapportée l'étude biochimique et fonctionnelle d'une interaction de KCC3 avec un partenaire protéique qui s'appelle CK-B. Finalement, les études fonctionnelles des mutations les moins délétères et l'identification de pathomécanismes additionnels qui mènent à la dysfonction de KCC3 (objectif 3) sont inclus dans les *Articles 1 et 3*.

Résultats

Les articles suivants, publiés ou en préparation, ont été réalisés au cours de ce projet :

Article 1 : Distal truncation of KCC3 in non-French Canadian HMSN/ACC families. Salin-Cantegrel A, Rivière JB, Dupré N, Charron FM, Shekarabi M, Karéméra L, Gaspar C, Horst J, Tekin M, Deda G, Krause A, Lippert MM, Willemsen MA, Jarrar R, Lapointe JY, Rouleau GA. *Neurology*. 2007 Sep 25; 69(13):1350–5.

Article 2 : HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type créatine kinase-dependant activation of the K⁺/Cl⁻ co-transporter 3. Salin-Cantegrel A, Shekarabi M, Holbert S, Dion P, Rochefort D, Laganière J, Dacal S, Hince P, Karemera L, Gaspar C, Lapointe JY, Rouleau GA. *Hum Mol Genet*. 2008 Sep 1;17(17):2703–11.

Article 3 : Transit defect of KCC3 is a major pathogenic mechanism in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. Salin-Cantegrel A, Shekarabi M, Rivière J-B, Rasheed S, DaCal S, Laganière J, Gaudet R, Rochefort D, Gaspar C, Lapointe J-Y, Rouleau GA. (*en révision pour J Biol Chem*)

Article 4 : Potassium-chloride co-transporter 3 and nerve dysfunction. Salin-Cantegrel A, Gaspar C, Lapointe JY, Rouleau GA. (*En préparation pour Arch Neurol*)

Article 1

Troncatures distales chez des patients NSMH/ACC

La majorité des cas québécois de NSMH/ACC est causée par une mutation fondatrice caractérisée par Howard et al. en 2002. Cette mutation, qui conduit à l'élimination des 336 derniers acides aminés de la protéine, n'affecte pas le transit jusqu'à la membrane plasmique dans les ovocytes de Xénope mais résulte en la perte d'activité intrinsèque du co-transporteur dans ce système. Nous avons donc décidé d'étendre le recrutement de patients hors du Québec afin d'identifier des mutations qui seraient moins délétères pour l'intégrité et peut-être aussi pour la fonction de KCC3. Ainsi, des échantillons de sang d'individus présentant les aspects cliniques de la maladie ont été prélevés en Afrique du Sud, en Hollande, au Soudan et en Turquie pour cette étude.

Avec cet article, nous fournissons l'identification de deux mutations et la caractérisation fonctionnelle de la mutation la plus commune dans le monde, puisqu'elle a été retrouvée indépendamment dans trois pays différents. Son étude a eu pour intérêt d'augmenter le nombre de caractérisations fonctionnelles de KCC3 mais surtout de confirmer que la perte de fonction du co-transporteur est systématique et nécessaire pour la génération du phénotype. De plus, elle permet d'expliquer les cas sporadiques retrouvés dans ces différents pays et fournit un outil dans la prévention de la maladie en Afrique du Sud (où elle se retrouve dans la population des Afrikaners probablement du fait d'un effet fondateur) et en Turquie (où les mariages consanguins sont fréquents).

Ce chapitre correspond à la publication suivante :

Salin-Cantegrel A, Rivière JB, Dupré N, Charron FM, Shekarabi M, Karéméra L, Gaspar C, Horst J, Tekin M, Deda G, Krause A, Lippert MM, Willemsen MA, Jarrar R, Lapointe JY, Rouleau GA. Distal truncation of KCC3 in non-French Canadian HMSN/ACC families. *Neurology*. 2007 Sep 25;69(13):1350-5.

Implication des auteurs :

Salin-Cantegrel A : clonage, immunomarquage, manipulation des oocytes de Xénope, analyse statistique des études fonctionnelles, conception et rédaction de l'article

Rivière JB : haplotypage, séquençage, analyse statistique des études génétiques, conception et rédaction de l'article

Dupré N : recrutement des patients, électroencéphalogramme, confirmation du diagnostic.

Charron FM : expériences de flux

Shekarabi M : discussion sur l'article et coopération sur le projet

Karéméra L : assistance technique

Gaspar C : corrections de l'article

Horst J, Tekin M, Deda G, Krause A, Lippert MM, Willemsen MA, Jarrar R : recrutement des patients

Lapointe J-Y : expertise en étude de flux

Rouleau GA : supervision et direction générale; correction du manuscrit

Title page

Title

Distal truncation of KCC3 in non-French Canadian HMSN/ACC families

A. Salin-Cantegrel* (MSc)¹, J.-B. Rivière* (MSc)¹, N. Dupré (MD, MSc)², F.M. Charron (MSc),³ M. Shekarabi (PhD)¹, L. Karéméra¹, C. Gaspar (PhD)¹, J. Horst (MD)⁴, M. Tekin (MD)⁵, G. Deda (MD)⁵, A. Krause (MD, PhD)⁶, M. M. Lippert (MD)⁶, M. A. A. P Willemsen (MD)⁷, R. Jarrar (MD)⁸, J.-Y. Lapointe (PhD)³, G.A. Rouleau (MD, PhD)¹.

** These two authors contributed equally to this work*

1. Centre for the Study of Brain Diseases, CHUM Research Centre - Notre-Dame Hospital and the university of montreal, Montreal, Québec, Canada.
2. Department of Neurological Sciences, CHAUQ-Enfant-Jesus, Quebec City, Québec, Canada.
3. Department of Physics, Université de Montreal, Montreal, Québec, Canada.
4. Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Munster, Munster, Germany.
5. Pediatric Molecular Genetics Department, Ankara University, School of Medicine, Ankara, Turkey.
6. Department of Human genetics, National Health Laboratory Service and University of Witwatersand, South Africa.
7. Department of Paediatric Neurology, University Medical Centre, St Radboud, Nijmegen, The Netherlands.
8. Gillette Children's Specialty Health Care, St Paul, MN 55101, USA.

Disclosure: The authors have reported no conflicts of interest

List of counts

References: 20

Figures: 3

Tables: 2

Title (characters): 58

Abstract: 224

Text: 2,333

Disclaimer: Salin-Cantegrel A. and Riviere J.-B. take full responsibility for the data, the analyses and interpretation, and the conduct of the research; they have full access to all of the data; and have the right to publish any and all data.

Abstract

Background: Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC) is a severe and progressive autosomal recessive polyneuropathy. Mutations in the potassium-chloride co-transporter 3 (*SLC12A6/KCC3*) were identified as responsible for HMSN/ACC in the French-Canadian population (FC). In the present study, the authors were interested in finding new mutations in non-FC populations, assessing the activity of mutant proteins and refining genotype-phenotype correlations.

Methods: The authors screened *KCC3* for mutations using direct sequencing in six non-FC HMSN/ACC families. They then assessed the functionality of the most common mutant protein using a flux assay in *Xenopus leavis* oocytes.

Results: The authors identified mutations in exon 22 of *KCC3*: a novel mutation (del+2994-3003; E1015X) in one family, as well as a known mutation (3031C→T; R1011X) found in five unrelated families and associated with two different haplotypes. The function of the co-transporter was abolished, although a limited amount of mutant proteins were correctly localized at the membrane.

Conclusions: *KCC3* mutations in exon 22 constitute the most recurrent mutation site for HMSN/ACC, regardless of ethnic origin, and are the only cause of HMSN/ACC in the non FC families analysed so far. Therefore, for genetic analysis exon 22 screening should be prioritized in non FC-populations. Finally, the R1011X mutation leads to the abrogation of *KCC3*'s function in *Xenopus leavis* oocytes, likely due to impaired transit of the co-transporter.

Introduction

Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC; OMIM #218000) is a severe progressive sensorimotor neuropathy associated with partial or complete agenesis of the corpus callosum, a delay in developmental milestones, a generalized hypotonia¹ and the deterioration of both physical and mental abilities over time².

Although rare worldwide, HMSN/ACC is found at the highest prevalence (1 in 2117 live births) in the Charlevoix and Saguenay Lac St-Jean regions of the province of Quebec, where the carrier frequency is high (1 in 23 individuals)³. The disease has also been reported in other countries^{4, 5}. The causative gene was shown to be *KCC3* (also known as *SLC12A6*), which codes for the potassium-chloride co-transporter 3 (KCC3)⁶. The vast majority of HMSN/ACC mutations (8/9 mutations identified so far, schematically depicted in Figure 2A) are predicted to prematurely truncate the protein^{6, 7}.

KCC3 modulates the regulatory volume decrease (RVD) response in hypotonic conditions⁸. Therefore, the swollen axons observed in HMSN/ACC¹ may result from a systematic loss of KCC3 function, with harmful effects on nervous system integrity. However, most phenotypic aspects of the disease remain to be explained and little is currently known about structure-function relationships in this co-transporter. In this regard, naturally-occurring mutations can help elucidate the pathogenesis of the syndrome and define KCC3 functional sub-domains.

We report here the identification of a novel HMSN/ACC mutation (del+2994-3003; E1015X) in a Sudanese family. We also provide the characterization of the most common HMSN/ACC mutation out of French Canada (FC) (3031C→T; R1011X), originally detected in a Turkish family⁶. We identified this mutation in cases of Dutch, Afrikaner and Turkish descent, found it associated with two different haplotypes and demonstrated the resulting mutant protein's non-functionality in *Xenopus leavis* oocytes.

Results

Mutation detection

Sequencing of exon 22 of the *KCC3* gene in six HMSN/ACC families of non-FC origin revealed that the cytosine-to-thymine transition (3031C→T) previously identified in a single Turkish family⁶ (Tur1, Fig. 1) was also present in four additional non-FC families. A total of eight cases from five distinct families of various origins (two Turkish families, two Afrikaner families from South-Africa and a Dutch family) were homozygous for this exon 22 mutation, which results in a premature stop codon at amino acid 1011 (R1011X). We also identified a novel 10-bp deletion within exon 22 of *KCC3* (del+2994-3003), resulting in a premature termination of translation at amino-acid 1015 (E1015X), in two affected siblings of Sudanese descent (Fig. 1). The direct sequencing of exon 22 also revealed known SNPs that permitted us to investigate the presence of a common haplotype among the five families sharing the 3031C→T mutation (Table 1). Two different haplotypes were identified, one of which was shared by the Afrikaner and the Dutch cases; the other haplotype was found in the Turkish patients.

Since the most common non-FC mutation observed in the *KCC3* gene targets exon 22, and since such truncation mutation only affects the distal part of the C-terminal domain (CTD) of *KCC3* (thus being the least deleterious *KCC3* mutation described so far), we investigated the functional consequences of distal CTD truncation in *KCC3*.

Functional studies

The effect of the distal C-terminal *KCC3* mutation was evaluated by the measurement of R1011X activity (the mutant protein encoded by the 3031C→T mutation in exon 22); this measurement was then compared to the activity of full-length (wt) and truncated L808X (resulting from an exon 18 truncation mutation) *KCC3* proteins. The function of the transporters was assessed by measuring the furosemide-sensitive uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ in groups of swollen oocytes. Upon hypotonic activation, the activity of wild-type

KCC3 was enhanced, as demonstrated by the significant increase in $^{86}\text{Rb}^+$ uptake (from 1,491 to 4,459 pmol/45min/oocyte; $P < 0.0001$ ANOVA; Fig. 2B). Contrary to this observation, furosemide-sensitive $^{86}\text{Rb}^+$ uptakes for L808X and R1011X mutants were fully abolished ($P < 0.001$ ANOVA; Fig. 2B). Thus, a truncation restricted to a third of the CTD (R1011X) is sufficient to completely inactivate the transporter. These data suggest that the transporter requires the deleted amino acid residues for its appropriate activation; alternatively, this loss-of-function could be attributable to the absence of the transporter at the plasma membrane due to the faulty intracellular transit of the co-transporter.

To further investigate these possibilities, we assessed the membrane localization of KCC3 on oocyte sections with an antibody raised against the N-terminal domain of the protein. We identified a potential mutation-associated anomaly in KCC3's transit to the membrane, since L808X and R1011X signals were weaker than full-length KCC3 membrane signal; however, all three expressed proteins were successfully detected at the membrane (Fig. 2C). These results suggest that the mutant proteins are translocated to the membrane, where they are non-functional.

Electroencephalogram (EEG)

Four out of 8 patients homozygous for the 3031C→T mutation presented epileptiform abnormalities on EEG or seizures, one patient had a normal EEG, and data were unavailable for 3 patients (Table S1). Comparatively, only 7 out of 83 patients (8.4%) presented an epileptiform electroencephalogram (EEG) in a large cohort of FC HMSN/ACC patients, all homozygous for the founder 2436delG mutation (unpublished data). Chi-square analysis revealed a positive association between the 3031C→T mutation and the epileptiform EEG phenotype in the non-FC cases presented here, when compared to the frequency of this phenotype in our large cohort of FC patients ($\text{Chi}(2) = 22.08$, 1 df, $P < 0.001$).

Discussion

Here we report the identification of a common genetic variant in the *KCC3* gene causing HMSN/ACC outside of Quebec. Haplotype analysis demonstrated that the variant found in the Afrikaner and the Dutch families came from the same ancestor, but occurred independently from the variant identified in the Turkish patients. It is indeed not surprising to find the same haplotype in the Afrikaner and the Dutch patients, since Afrikaner ancestors were Dutch settlers. The unavailability of additional samples from Turkey, the Netherlands and South Africa does not allow us to estimate the 3031C→T transition carrier rate in these populations. However, our data strongly suggest that this mutation may be a recurrent cause of HMSN/ACC in these countries. Therefore, the screening of exon 22 should be prioritized for HMSN/ACC diagnostic and prenatal testing in non-FC populations. The lack of known consanguinity in the two Afrikaner families and in the Dutch family further suggests that this variant is probably more frequent in South Africa and in the Netherlands than in Turkey. Moreover, despite the total absence of descriptions of the occurrence of HMSN/ACC in the Afrikaner population in the literature, this disease may be more frequent in this population isolate than in other parts of the world, due to its relative genetic homogeneity.

It is interesting to note that 3 of the 6 families are consanguineous unions, and 2 of the remaining 3 families are part of a founder population. These data suggest that HMSN/ACC is a rare disease where high frequencies will only occur in founder populations and consanguineous unions. In addition, these data suggest that no positive selective pressures, at least in the populations studied, have acted to increase disease allele frequency, as is the case for Cystic Fibrosis and Sickle Cell Anemia.

The evidence for a link between seizure disorders and SLC12 protein family members (to which the KCC proteins belong) has been increasing in the recent years. For example, NKCC1 inhibition suppresses epileptiform activities in hippocampal sections¹⁰, whereas hypomorphic KCC2-deficiency in mice leads to an increased accumulation of Cl⁻

in neuronal cells, which facilitates the manifestation of seizures^{11, 12}. In addition, recent data suggest that anomalies in chloride co-transporter levels contribute to temporal lobe epilepsy¹³. Finally, mutations in the K^+/Cl^- co-transporter *kazachoc*, known as the only *Kcc* in *Drosophila*, increase seizure susceptibility in the fly¹⁴ and *KCC3* null mice also display reduced seizure threshold¹⁵. Consistently with these models, we suggest that HMSN/ACC cases bearing the 3031C→T transition may have an increased risk to develop epileptiform EEG abnormalities. However, considering the small number of cases with 3031C→T transition presented here, we are aware that the statistical results presented here should be taken with caution. A larger sample will be needed to validate this association.

Even though all known nonsense mutations are predicted to abolish *KCC3* function, the common exon 22 mutation and the exon 18 FC mutation may lead to distinct phenotypes, which could partly explain our preliminary observation of an increased frequency of epileptiform EEG results associated with the exon 22 3031C→T mutation. One explanation might stem from the nature of the truncation mutations, where differential inactivation or translocation patterns could be related to epileptiform abnormalities on EEG through a yet unknown mechanism.

We provide evidence that the mutations characterized here result in *KCC3*'s inactivation. Given the fact that the vast majority of HMSN/ACC mutations (Fig. 2A) result in a premature stop codon, protein truncation is the recurrent mechanism leading to this disease. To date, evidence for the functional inactivation of *KCC3* in HMSN/ACC stems from one single publication involving the exon 18 FC mutation¹. However, exon 18 alterations remove over three-quarters of the CTD of *KCC3* and can only be found in the FC population. The results of the present genetic study suggest that exon 22 mutations are more widespread worldwide, causing HMSN/ACC in ethnically diverse populations. In addition, exon 22 mutations remove only a third of the CTD and constitute, so far, the least deleterious truncation of *KCC3*. Therefore, we decided to perform a functional characterization of this mutant form of the protein and we found that the loss of the distal third of the CTD (140 amino acids) was sufficient to deregulate and inactivate the co-

transporter. Therefore, this 140 amino acid segment defines the smallest distal functional domain of KCC3 so far identified.

We also assessed this protein's proper localization at the plasma membrane. All entities were detectable at the membrane, suggesting that the mutant forms of KCC3 are, at least in part, still correctly processed to the membrane. Since the *Xenopus leavis* oocyte expression system is not adequate for quantification of protein levels, but is mainly used to assess functionality of the different protein species, it remains to be determined if alterations in local amounts of this co-transporter are involved in the mechanism of this disease, either through haploinsufficiency or dominant negative effects, as has been previously reported¹⁶⁻¹⁹. Thus, quantitative level of expression differences may participate in the huge complexity and variability of the HMSN/ACC phenotype; the reported association of 5'UTR variants of KCC3 mRNA and subsequent protein level modifications with bipolar disorder (a HMSN/ACC comorbid phenotype)²⁰ also support this idea, which remains to be investigated. Other mechanisms that can lead to impaired function of a transporter include the absence of protein resulting from the selective degradation of nonsense and frameshift mutant mRNAs. In addition, detrimental modifications in protein conformation and/or a loss of the regulatory role of the CTD, or the impairment of are most likely the cause of the transporter's inactivation. . Further experiments are required to establish which of these mechanisms, together or in combination, is involved in the pathology and phenotypic presentation of HMSN/ACC.

Materials and Methods

Clinical presentation and mutation screening of KCC3

Blood samples from 6 families (Fig. 1) were collected with informed consent: two families from Turkey, two from South-Africa, one from Sudan and one from Holland. DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by standard methods. Clinical diagnosis of the disease was made by a neurologist (ND) according to the known basic features of HMSN/ACC. Detailed clinical features are presented in Table S1. All 26 exons of *KCC3* were amplified by PCR with intronic primers and directly sequenced on an ABI 3700 sequencer, according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Functional assay

Plasmid constructs

The full-length *KCC3a* cDNA subcloned in a modified pGEMHE vector was used as the starting construct to allow expression of wild-type (wt) *KCC3* in *X. laevis* oocytes. Subsequently, the full-length *KCC3* construct was digested by *HindIII* to produce a truncated L808X cDNA, which encodes a truncated transporter similar to the previously studied FC mutant protein (*KCC3Q*; T813X) bearing mutations in exon 18 (ref). The HMSN/ACC 3031C→T nonsense mutation in exon 22 of *KCC3* was introduced by site-directed mutagenesis using a downstream primer (5'-GCTCTAGATCTGTCTCACTCTGTTTTGGA-3') bearing the 3031C→T mutation to generate the R1011X mutant (see Fig. 2A for construct design).

Functional assay

The three pGEMHE templates were linearized and the cRNAs were transcribed *in vitro* using T7 RNA polymerase. The co-transporter activity was determined by assessing $^{86}\text{Rb}^+$ uptake in groups of 8-12 *X. laevis* oocytes injected with 46 nl of water with or without wt or mutant cRNA. The uptake experiment consisted in a 60 min incubation

period in a hypotonic medium (mM: 52 Na-Cyclamate, 3.3 KCl, 0.74 CaCl₂, 0.82 MgCl₂, 10 HEPES/Tris, pH 7.4, with 10μM ouabain), followed by an incubation in an uptake medium (mM: 49 NaCl, 15 Na-Cyclamate, 0.74 CaCl₂, 0.82 MgCl₂, 30 RbCl, 10 HEPES/Tris, pH 7.4 and 10μM ouabain supplemented with 50μCi of ⁸⁶Rb⁺-Cl⁻). The KCC3-dependant uptake of ⁸⁶Rb⁺ was deduced by exposing groups of cRNA-injected oocytes to 1mM furosemide.

Immunocytochemistry

Oocytes were fixed in iced-cold methanol containing 1% formaldehyde. Fixed oocytes were then incubated overnight in a 30% sucrose Barth's solution, embedded and 10 μm thick cryosections of wt or mutant oocytes were placed on the same glass slide to allow comparison⁹. Non-specific antibody binding was blocked in 5% normal goat serum (NGS) in PBS. Incubation with anti-KCC3 antibody raised against the N-terminus (1:500) in 0.5% NGS in PBS was performed overnight. Incubation with secondary antibody coupled to Rhodamine (1:1000) was performed and the sections were mounted for microscope observation.

Statistical analysis

Significance is defined as two-tailed $P < 0.05$, and the results are presented as means \pm SD. The significance of the differences between oocyte groups was tested by one-way *ANOVA*. A standard Chi Square calculation was performed to assess the association between the epileptiform EEG phenotype and the 3031C→T transition.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. D. B. Mount for providing the KCC3 cDNA and antibody and Dr. P. Dion for discussion and review of the manuscript. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research and the Fondation des Jumelles Coudé.

Table 1

Table Interfamily shared haplotypes in families with the 3031C→T transition								
Identifier	bp	Alleles	Freq*	SAF1	SAF2	DUT1	TUR1	TUR2
rs347836	32415862	C/G	0.604	CC	C/G*	CC	GG	GG
Rs7164902	32338374	C/T	0.767	CC	CC	C/T*	CC	CC
Rs2290940	32331760	G/A	0.667	GG	GG	GG	GG	GG
Rs2290941	32331643	G/T	—	GG	GG	GG	GG	GG
Rs2705342	32331630	C/T	—	CC	CC	CC	CC	CC
Rs2705341	32331623	C/T	—	CC	CC	CC	CC	CC
Rs2290942	32331566	C/A	0.667	CC	CC	CC	CC	CC
Rs2615352	32331558	C/G	—	CC	CC	CC	CC	CC
Rs2244040	32331482	C/A	0.583	AA	AA	AA	CC	CC
Rs17236798	32330164	C/G	0.667	GG	GG	GG	GG	GG
Rs17817806	32317068	A/G	0.667	TT	TT	TT	TT	TT
Rs4577050	32316240	T/C	0.683	CC	CC	CC	TT	TT
c.3031C→T	32316212	C/T	—	TT	TT	TT	TT	TT
Rs16958873	32312880	A/G	0.917	AA	AA	A/G*	AA	AA

— Indicates unknown frequencies.

*Refers to the frequency of the first allele (determined in European samples).

*Phase undetermined.

Figure legends

Figure 1

(A) SAF1 and SAF2 are Afrikaner families from South Africa. Family DUT1 originates from the Netherlands. Families TUR1 and TUR2 originate from Turkey. (B) All affected individuals of these five families are homozygous for the 3031C→T transition (R1011X). (C) Family SUD1 originates from Sudan; two affected individuals are homozygous for the del 2994-3003 mutation (E1015X). WT : wild-type sequence; mut : mutated sequence.
*Patients with epileptiform abnormalities on EEG.

Figure 2

(A) Schematic representation of wild-type and truncated KCC3 constructs. The 12 transmembrane segments of KCC3 are represented in gray (I–XII). The L808X protein product is similar to the French Canadian mutant, and the R1011X protein represents the most common KCC3 mutant form. The number of amino acid residues deleted is indicated at the end of each mutant protein diagram. (B) Flux assay of full-length KCC3 (wt), L808X, and R1011X in *X laevis* oocytes. Representative measurements of $^{86}\text{Rb}^+$ uptake under hypotonic conditions in *X laevis* oocytes injected with the wild-type (KCC3) or mutant (L808X and R1011X) constructs. Total fluxes are indicated by black columns; the white columns correspond to the fluxes insensitive to 1 mM furosemide. The indicated SDs have been calculated for experimental groups of eight or more oocytes. Wild-type KCC3 activation mediated a significant transport, which was fully abolished by 1 mM furosemide. In contrast, neither of the mutant transporters was activated in the same conditions. Upper right corner, mean furosemide-sensitive fluxes calculated from 10 independent experiments. Note the furosemide-sensitive flux in control oocytes due to the activity of the endogenous *X laevis* KCC. (C) Immunofluorescence analysis of KCC3 localization at the membrane of *X laevis* oocytes. KCC3 immunostaining of 10 μm thick cryosections of (upper left) a water-injected oocyte as a control, (upper right) a wt KCC3-injected oocyte,

(lower left) a L808X-injected oocyte, and (lower right) a R1011X-injected oocyte (each representative of 10 stainings, all shown at a 63x magnification). Lower left corners: corresponding 16x magnification of whole oocytes stained in red for KCC3. cyt indicates the cytoplasm, mb indicates the plasma membrane.

Figure 1.

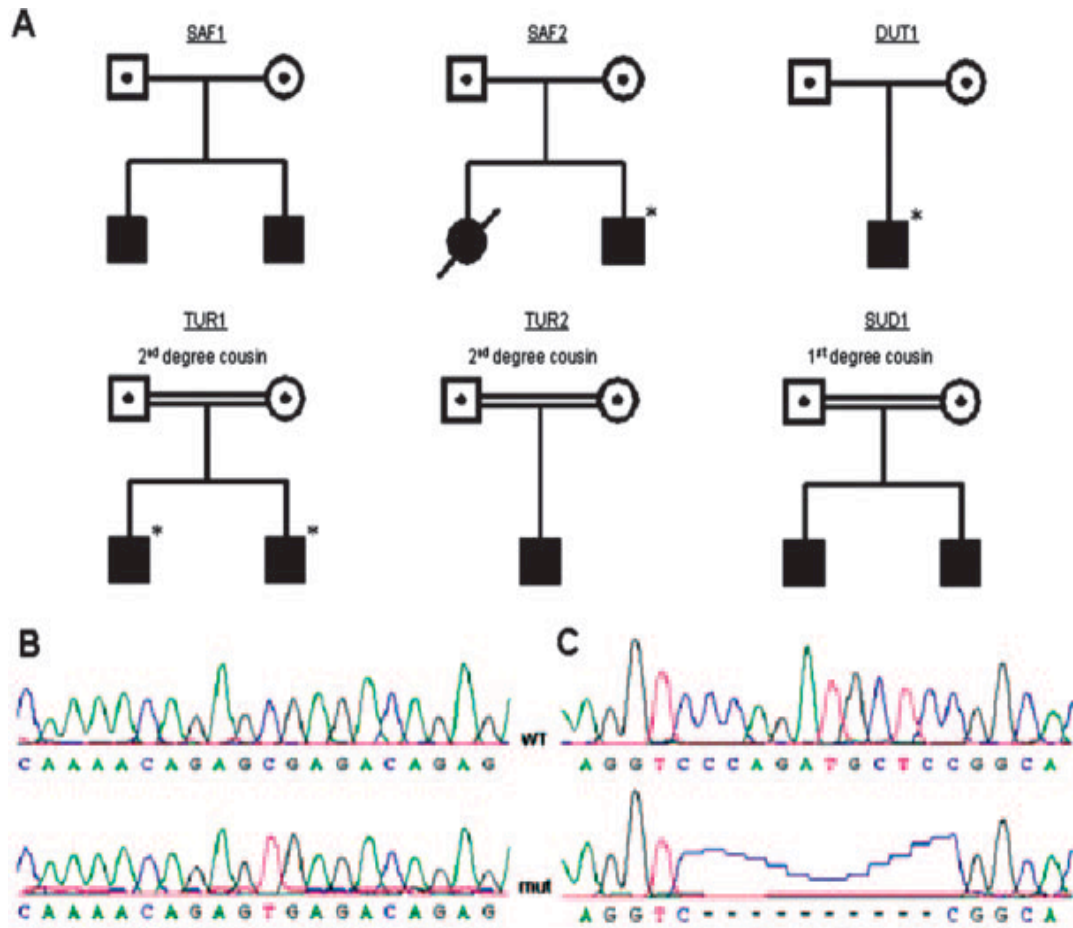
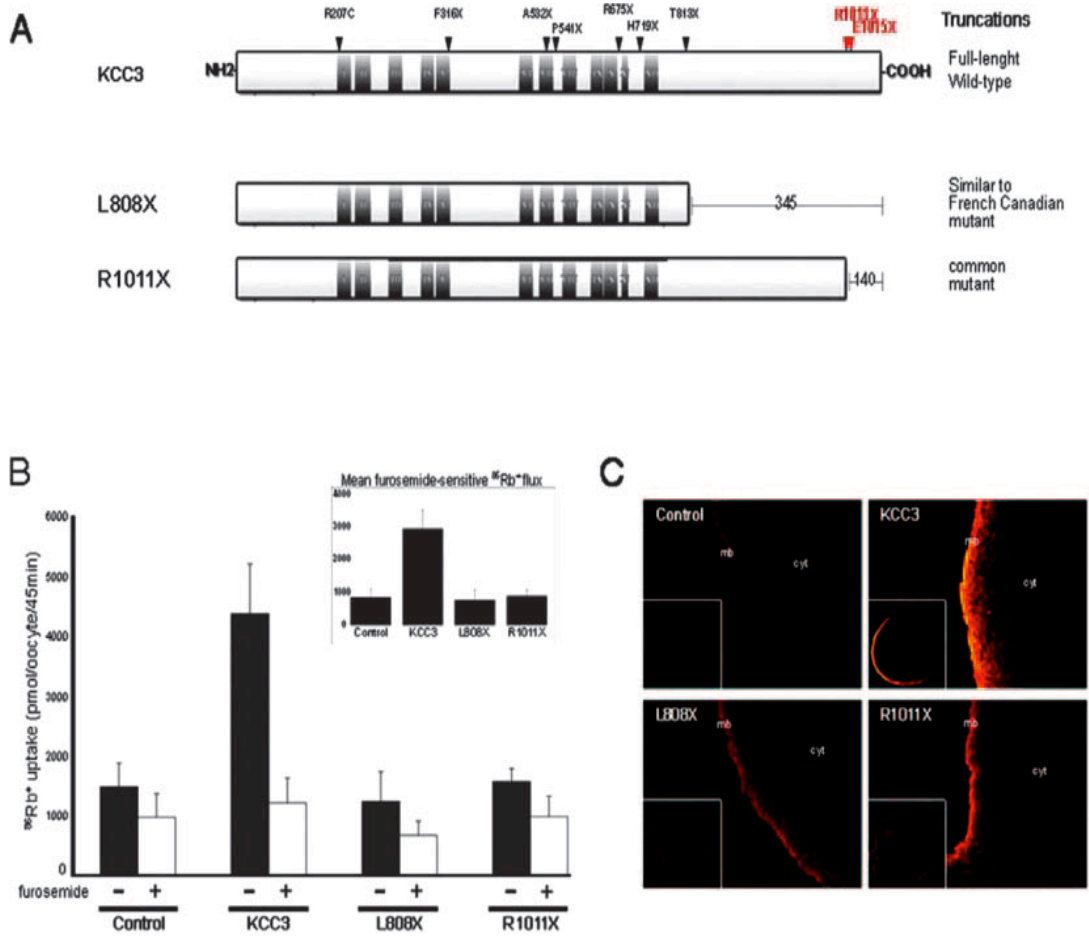


Figure 2.



Supplementary data

Table E-1. Clinical presentation

Family KCC3 mutation Ethnicity	Clinical features (age)	MRI, Biopsy, EEG (age)
TUR1 - Case 1 3031C→T Turkish (Black Sea) Parents 2nd degree cousins	4 y Moderate mental retardation Absent reflexes Walks with walker (4 y) No seizures	Cranial ultrasound (19 months): complete ACC EEG (4y): epileptiform activity
TUR1 - Case 2 3031C→T Turkish (Black Sea) Parents 2nd degree cousins	5 y Moderate mental retardation Hypotonia Absent reflexes Walks with ortheses (3.5 y) Uses wheelchair (5 y) No seizures	Brain MRI (2y): complete ACC EEG (2y): epileptiform activity
SAF2 - Case 3 3031C→T South African (white)	5 y Moderate mental retardation Hypotonia Moderate amyotrophy Absent reflexes Walks with walker (5 y) Generalized seizures (5 y)	Brain MRI (5y): complete ACC EEG (5y): epileptiform activity (Fig. 5)
SAF2 - Case 4 3031C→T South African (white)	11y Moderate mental retardation Severe amyotrophy Walked only with walker Eventually wheelchair bound No seizures	No MRI No EEG
SAF1 - Case 5	Mild mental retardation	No MRI

3031C→T South African (white)	Partial gaze palsy Delayed motor development Achieved walking independently No mention of seizures	No mention of EEG
SAF1 - Case 6 3031C→T South African (white)	Delayed motor development No seizures	No MRI No EEG
TUR2 - Case 7 3031C→T Turkish Parents 2nd degree cousins	6 y Mild mental retardation Moderate amyotrophy Absent reflexes Walked with walker (4 y) No seizures	Brain MRI (1y): complete ACC EEG (1y): normal
DUT1 - Case 8 3031C→T Dutch	16 y Moderate mental retardation Severe amyotrophy Absent reflexes Walked independently (3 y) Wheelchair bound (6 y) Partial and absence seizures (4 y)	Brain MRI (6y): complete ACC Sural nerve biopsy (6y): normal myelin sheaths, no enlarged axons EEG (2 y): epileptiform activity
SUD1 - Case 9 del+2994-3003 Sudanese (Black) Parents 1st degree cousins	11 y Mild mental retardation Moderate amyotrophy Absent reflexes Walked with walker (5 y) No seizures	Brain MRI (13y): complete ACC No EEG
SUD1 - Case 10 del+2994-3003 Sudanese (Black) Parents 1st degree cousins	9 y Mild mental retardation Moderate amyotrophy Absent reflexes Walked independently (7 y) No seizures	Brain MRI (9y): complete ACC No EEG

ACC, agenesis of the corpus callosum; y, years; MRI, magnetic resonance imaging; EEG, electroencephalogram; EMG, needle electromyography

References

1. Dupre N, Howard HC, Mathieu J et al. Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol*. 2003;54:9-18
2. Filteau MJ, Pourcher E, Bouchard RH et al. Corpus callosum agenesis and psychosis in Andermann syndrome. *Arch Neurol*. 1991;48:1275-1280
3. De Braekeleer M, Dallaire A, Mathieu J. Genetic epidemiology of sensorimotor polyneuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in northeastern Quebec. *Hum Genet*. 1993;91:223-227
4. Battistella PA. Occurrence of Andermann syndrome out of French Canada--agenesis of the corpus callosum with neuronopathy. *Neuropediatrics*. 1993;24:239
5. Lesca G, Cournu-Rebeix I, Azoulay-Cayla A et al. [Andermann syndrome in an Algerian family: suggestion of phenotype and genetic homogeneity]. *Rev Neurol (Paris)*. 2001;157:1279-1281
6. Howard HC, Mount DB, Rochefort D et al. The K-Cl co-transporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet*. 2002;32:384-392
7. Uyanik G, Elcioglu N, Penzien J et al. Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology*. 2006;66:1044-1048
8. Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J et al. Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ co-transporter. *J Biol Chem*. 1999;274:10661-10667
9. Bissonnette P, Noel J, Coady MJ, Lapointe JY. Functional expression of tagged human Na⁺-glucose co-transporter in *Xenopus laevis* oocytes. *J Physiol*. 1999;520 Pt 2:359-371
10. Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med*. 2005;11:1205-1213

11. Tornberg J, Voikar V, Savilahti H et al. Behavioural phenotypes of hypomorphic KCC2-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 2005;21:1327-1337
12. Woo NS, Lu J, England R et al. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl co-transporter gene. *Hippocampus.* 2002;12:258-268
13. Palma E, Amici M, Sobrero F et al. Anomalous levels of Cl⁻ transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006
14. Hekmat-Safe DS, Lundy MY, Ranga R, Tanouye MA. Mutations in the K⁺/Cl⁻ co-transporter gene *kazachoc* (*Kcc*) increase seizure susceptibility in *Drosophila*. *J Neurosci.* 2006;26:8943-8954
15. Boettger T, Rust MB, Maier H et al. Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *Embo J.* 2003;22:5422-5434
16. Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest.* 2005;115:2010-2017
17. Waters MF, Minassian NA, Stevanin G et al. Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet.* 2006;38:447-451
18. Ballester LY, Benson DW, Wong B et al. Trafficking-competent and trafficking-defective KCNJ2 mutations in Andersen syndrome. *Hum Mutat.* 2006;27:388
19. Yoo D, Flagg TP, Olsen O et al. Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem.* 2004;279:6863-6873
20. Meyer J, Johannssen K, Freitag CM et al. Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2005;8:495-504

Article 2

Interaction de KCC3 avec la créatine kinase spécifique au cerveau

L'altération quasi systématique qui conduit à la NSMH/ACC est la perte de fragments C-terminaux de KCC3. L'article précédent a montré que les délétions peptidiques allant jusqu'à 140 acides aminés mènent à l'inactivation fonctionnelle de KCC3 et suggère que le domaine C-terminal participe à la régulation du co-transporteur *via* des interactions protéine-protéine. Nous nous sommes donc appliqués à identifier les partenaires de KCC3. Dans le contexte de cet article, nous nous sommes intéressés aux protéines qui, selon la littérature, interagissent avec d'autres KCC. Il a été rapporté que KCC2 a pour partenaire C-terminal la créatine kinase spécifique au cerveau (CK-B) et que cette interaction aurait une incidence fonctionnelle sur l'activité de KCC2 (Inoue et al. 2006). Étant donné que la région d'interaction identifiée sur KCC2 est très homologue aux portions tronquées de KCC3, CK-B était un candidat d'interaction directe très prometteur.

Cet article a mené à l'identification et la caractérisation de l'interaction entre KCC3 et CK-B ainsi qu'à la détermination de son importance fonctionnelle. Avant ce travail, seuls des partenaires interagissant avec le domaine N-terminal de KCC3 avaient été identifiés, alors même que le C-terminus est le plus grand domaine du co-transporteur. Cette étude a donc eu pour intérêt d'établir que l'importance du C-terminus est liée à des interactions protéiques fonctionnelles. Elle a aussi permis d'avancer nos connaissances concernant l'interactôme de KCC3. Enfin, nous avons aussi eu pour la première fois des évidences que des mécanismes protéomiques participent à la perte de fonction de KCC3 dans la NSMH/ACC.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Salin-Cantegrel A, Shekarabi M, Holbert S, Dion P, Rochefort D, Laganière J, Dacal S, Hince P, Karemera L, Gaspar C, Lapointe JY, Rouleau GA. HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K⁺/Cl⁻ co-transporter 3. Hum Mol Genet. 2008 Sep 1;17(17):2703-11.

Implication des auteurs :

Salin-Cantegrel A : stratégie expérimentale, expériences, conception et rédaction de l'article.

Holbert S : expériences complémentaires double hybride

Shekarabi M, Dion P : discussion sur l'article et coopération sur le projet

Dacal S : expériences de flux

Rochefort D, Laganière J, Hince P, Karemera L : assistance technique

Gaspar C : correction du manuscrit

Lapointe J-Y : expertise en étude de flux

Rouleau GA: supervision et direction générale; correction finale du manuscrit

Title page

HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K^+/Cl^- co-transporter 3.

Authors :

Adèle Salin-Cantegrel¹, Masoud Shekarabi¹, Sébastien Holbert¹, Patrick Dion¹, Daniel Rochefort¹, Janet Laganière¹, Sandra Dacal², Pascale Hince¹, Liliane Karemera¹, Claudia Gaspar¹, Jean-Yves Lapointe², Guy A. Rouleau^{1*}

¹Centre of Excellence in Neuromics, CHUM Research Centre - Notre-Dame Hospital and University of Montreal. Montreal. H2L 4M1, Canada.

²Department of physics - University of Montreal. Montreal. H3C 3J7, Canada.

*corresponding author

Abstract

The potassium-chloride co-transporter 3 (KCC3) is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC); however, the molecular mechanisms of HMSN/ACC pathogenesis and the exact role of KCC3 in the development of the nervous system remain poorly understood. The functional regulation of this transporter by protein partners is also largely unknown. Using a yeast two-hybrid approach, we discovered that the C-terminal domain (CTD) of KCC3, which is lost in most HMSN/ACC-causing mutations, directly interacts with brain-specific creatine kinase (CK-B), an ATP-generating enzyme which is also a partner of KCC2. The interaction of KCC3 with CK-B was further confirmed by an in vitro glutathione S-transferase pull-down assay, followed by the sequencing of the pulled-down complexes. In transfected cultured cells, immunofluorescence labeling showed that CK-B colocalizes with wild-type KCC3, whereas the kinase fails to interact with the inactive truncated KCC3. Finally, CK-B's inhibition by DNFB results in reduction of activity of KCC3 in functional assays using *Xenopus laevis* oocytes. This physical and functional association between the co-transporter and CK-B is therefore the first protein-protein interaction identified to be potentially involved in the pathophysiology of HMSN/ACC.

Introduction

Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC) is an autosomal recessive severely invalidating and ultimately fatal disease. Both development and maintenance of the integrity of the nervous system are impaired, and the most striking histopathological findings include abnormal axonal migration through the brain midline and massive swelling of peripheral nerves accompanied by demyelination (1). HMSN/ACC is a monogenic disease caused by mutations in the *KCC3* gene, which codes for the potassium-chloride co-transporter 3 (KCC3) (2). Since KCC3 allows the outward transport of K^+ and Cl^- ions and subsequently water through the plasma membrane, the protein is thought to be involved in regulatory volume decrease (RVD) response and ion homeostasis (3, 4). Therefore, we suspect that a complete loss of function of the transporter may account for the swollen axons observed in patients, a hallmark of HMSN/ACC pathology. However, many aspects of the disease remain to be explained.

Several topology studies reported that KCC3 is a large integral glycoprotein that contains twelve membrane-spanning domains and includes a variable N-terminal region and a large C-terminal domain (CTD) within the cytoplasm (3, 5-7). Truncation of the CTD is predicted to occur in most of the HMSN/ACC mutations (8/9 mutations) (2, 8, 9), suggesting a key role for this part of the protein. We have so far performed functional studies of the two mutations most commonly found worldwide (2436delG, T813fsX813 and 3031C→T, R1011X), and demonstrated that: (1) a mutation in exon 18, which is found in the French-Canadian population at a high rate, truncates a third of the whole protein and inactivates the co-transporter (2); (2) a mutation in exon 22 produces the R1011X truncated form of KCC3 in ethnically diverse populations, and also inactivates the transporter, even if only a third of the CTD is missing (9). These data reinforce the hypothesis that the CTD in KCC3 is critical for function, possibly due to defective protein-protein interactions.

In a recent study, it was shown that the neuronal specific KCC2, a protein involved in the determination of resting (Cl^-)_i, interacts with brain-type creatine kinase (CK-B) via the CTD of this co-transporter (10). Using an electrophysiological approach, the authors demonstrated that CK-B activates KCC2 in their HEK293 cellular transfection model (11). It was also strongly suggested that creatine kinases play a key role in the activation of potassium-chloride co-transport in red blood cells (12). The key requirement for creatine kinases, including CK-B, in mammalian cells is primarily linked to the cytoplasmic instability of ATP: in order to shuffle energy within the cell, the inorganic phosphate (P_i) of ATP is conjugated with creatine to produce phospho-creatine. Phospho-creatine is high in energy and stable, but, contrary to ATP, its energy is unavailable for direct usage. In the nervous system, phospho-creatine is the prime substrate for CK-B, which catalyses the transfer of P_i from phospho-creatine to ADP. CK-B thus allows the production of ATP in a precisely-controlled spatial and temporal manner (13).

The aims of the present study are to (1) investigate the potential interaction between CK-B and KCC3, (2) assess the impact of this key protein-protein interaction on the function of the transporter and (3) deduct its contribution to HMSN/ACC pathogenesis. Our findings show that KCC3 naturally-occurring truncation mutations lead to a loss of interaction between the transporter and the CK-B. This interaction has a major impact on the activity of the co-transporter, similar to the functional defect of HMSN/ACC truncated KCC3.

Results

Yeast-two hybrid and GST pull-down assays identify CK-B as a binding partner of KCC3.

The CTDs of KCC2 and KCC3 are highly homologous, excepting KCC2's extra domain that confers its K^+/Cl^- constitutive transport activity (14, 15). The average amino

acid sequence identity is even higher within the distal portion of the CTD (see the partial alignment of the last 140 amino acids of potassium-chloride co-transporters in Figure 1), where the interaction between KCC2 and CK-B has been reported to occur (10). To verify if a specific interaction of KCC3 with CK-B could be detected, we undertook a yeast-two hybrid (Y2H) approach by using a chimerical KCC3 CTD (amino acids 669-1150) construct as the bait. A positive interaction in yeast cells co-transformed with KCC3 and CK-B constructs was identified when cells were grown on selective medium lacking leucine, tryptophan and histidine (-L/W/H) (Figure 2a). The growth was restricted on this selective medium, compared to the growth on -L/W medium or positive controls grown on -L/W/H medium (data not shown). A weak but discernable β -galactosidase activity was detected by colony lift assay (Figure 2b). Our results support the hypothesis of an interaction between KCC3 and CK-B in this Y2H system; however, this interaction appears to be restricted, either due to a weak binding between the two proteins or due to properties inherent to the Y2H assay method.

To confirm the interaction between CK-B and KCC3 detected by Y2H assay, we subsequently performed an *in vitro* binding assay using the glutathione S-transferase (GST) fusion protein affinity binding method, which allows the highly sensitive identification of binding partners by subsequent protein sequencing. For the GST pull-down assay we fused the whole CTD of KCC3 in frame with a GST epitope and expressed the chimeric fusion protein in the presence of 1mM IPTG (Figure 3a). Since CK-B is strongly expressed in the nervous system, as detected in Figure 3b and reported by others (16), immobilized GST-tagged KCC3 CTD proteins were incubated with a total protein extract from mouse brain. The resulting protein complexes (Figure 3c) were identified by LC-MSMS analysis, which showed that GST-CTD co-precipitates with the endogenously expressed CK-B (Figure 3d). These results strongly support the specificity of the interaction between KCC3 and CK-B.

Wild-type KCC3 colocalizes with CK-B *in vivo* and *in vitro*.

We and others have determined that KCC3 (Pearson, 2001) and CK-B (Tachikawa, 2004, and Figure 3b) are both endogenously expressed in the mouse brain at important levels; therefore, using dual-fluorescence immunohistochemical assays, we ascertained the cellular coexpression of endogenous KCC3 and CK-B in adult mouse brain. We found that colocalization of the two proteins was especially strong in cells of the hippocampus and the corpus callosum (Figure 4a).

To further characterize the interaction between these two proteins, we transfected HeLa cells with a construct bearing the full-length KCC3 cDNA. Adequate expression of transfected KCC3 and endogenous CK-B was confirmed by Western blot (Figure 4b and 4c). Using immunofluorescence labeling, we determined that, as expected, overexpressed KCC3 exhibited a membranous localization, with occasional intracellular localization. The interest of using HeLa cells in this study lies on the fact that they not only have a relatively low endogenous KCC3 expression, as detected by Western blot (Figure 4b) and by immunofluorescence labeling of non-transfected cells (Figure 4d), but these commonly used cells also express CK-B endogenously. Using dual-immunofluorescence labeling for KCC3 and CK-B, we observed that overexpressed KCC3 and endogenous CK-B colocalize in HeLa cells: the fluorescence patterns of CK-B and KCC3 substantially overlapped at the cell periphery (Figure 4d).

The KCC3 region of interaction with CK-B lies in the distal 140 amino acids of the co-transporter's CTD.

Since the CTD is the region that mediates KCC3's binding to CK-B, we next attempted to determine the impact of the least deleterious of the HMSN/ACC-associated KCC3 CTD truncation mutations on this interaction. Most of the inherited nonsense mutations so far identified in the KCC3 gene lie upstream of the CTD and result in the total loss of the CTD. However, we have recently characterized a less deleterious truncation, R1011X, which results in the loss of less than a third of the CTD (the most distal 140

amino acids of KCC3), which leads to the loss of function of the co-transporter (9). We therefore tested the ability of the smallest amino acid fragment whose loss is known to cause HMSN/ACC to interact with CK-B in a Y2H system. For this purpose, the whole CTD of human KCC3 (amino acids 669-1150; CTD in the Figure) and the last 140 amino acids (140-CTD) were used as ‘bait’ proteins, while human CK-B was used as ‘prey’. We found a positive interaction between both CTD fragments and CK-B (Figure 5a). This result implies that the specific site of interaction between KCC3 and CK-B lies within the last 140 amino acids of KCC3’s CTD, suggesting that all HMSN/ACC truncation mutations identified so far necessarily lead to the loss of the interaction with CK-B. We further tested the capacity of smaller distal fragments of KCC3 to interact with CK-B by Y2H, and determined the precise localization of the CK-B binding site to be within the last 18 amino acids of KCC3’s CTD (Figure 5b and supplemental data Figure S).

Loss of colocalization of truncated KCC3 and CK-B implies an impaired interaction between the two proteins.

The ability of CK-B to bind KCC3’s CTD, and the fact that the loss of the CTD (or segments of it) leads to HMSN/ACC, suggest that the disruption of this interaction could play a crucial role in disease pathogenesis. To further investigate the impact of the HMSN/ACC-associated C-terminal R1011X mutation on KCC3’s interaction with CK-B, we used dual-immunofluorescence labeling of HeLa cells transfected with the mutant form of KCC3 (R1011X) lacking the last 140 amino acids. In contrast to what was observed for wild-type KCC3, we observed that truncated KCC3 is almost completely retained in the cytoplasm of transfected HeLa cells (Figure 5d). Furthermore, the colocalization of the co-transporter and CK-B seen for wild-type KCC3 is lost in the R1011X mutant (Figure 5d). This finding confirms that the HMSN/ACC-associated truncation abrogates the interaction of the mutant co-transporter with its natural partner, CK-B.

Inhibition of CK-B blocks KCC3's activity in a *Xenopus laevis* oocyte flux assay.

To ascertain the nature of the interaction between KCC3 and CK-B at a functional level, a flux assay was developed that monitored ion transport triggered by KCC3's activation upon hypotonic stimulation. For this, wild-type KCC3 was expressed in *Xenopus laevis* oocytes (Figure 6a) and the flux of $^{86}\text{Rb}^+$ across the plasma membrane was measured as a marker of KCC3 activity; the specificity of the transport was confirmed in parallel by using 1mM furosemide (from 2618 +/- 325 pmol/oocyte/45 min to 832 +/- 99 pmol/oocyte/45 min; *ANOVA* $p < 0,0005$), an efficient cation-chloride co-transporter inhibitor. In order to evaluate the impact of creatine kinase on KCC3 activity, KCC3-injected oocytes were subsequently incubated with 50 μM of 2,4-Di-Nitro Fluoro Benzene (DNFB), which was reported as a 'fairly good' creatine kinase inhibitor (11, 12). In these conditions, the $^{86}\text{Rb}^+$ flux was shown to be inhibited to the same extent as that observed under furosemide inhibition (977 +/- 48 pmol/oocyte/45 min; *ANOVA* $p < 0,0005$), suggesting that DNFB inhibition of endogenous creatine kinases completely abolished KCC3-mediated flux of $^{86}\text{Rb}^+$ (Figure 6b). When co-injected with KCC3's RNA, exogenous CK-B did not enhance the $^{86}\text{Rb}^+$ uptake, but prevented the flux from being fully inhibited at a low concentration of DNFB (50 μM). Instead, an inhibitor concentration of 200 μM (four-fold) was required for significant inhibition of KCC3-mediated flux of $^{86}\text{Rb}^+$, when KCC3 and CK-B were co-injected (Figure 6c). These data imply that CK-B is required for the activation of KCC3 and suggest a functional interaction between the two proteins.

Discussion

The present study demonstrates that KCC3 physically and functionally interacts with CK-B, an enzyme essential for the generation of ATP. To document the physical interaction between these proteins, we used a variety of approaches, including a Y2H system, GST pull-down and immunofluorescence colocalization. Using the Y2H system we further demonstrated that KCC3's site of binding to CK-B lies within the last 18 amino acids of the transporter, a domain that is lost in all HMSN/ACC-associated truncation mutations. As a result of HMSN/ACC truncation, CK-B's colocalization with KCC3 is no longer observed in immunofluorescence studies. Finally, we used the inhibitory action of DNFB to reveal the crucial role of CK-B activity upon the function of KCC3.

The detection of a physical interaction between KCC3 and CK-B is in agreement with a previous report of a direct interaction between KCC2 and CK-B. However, our observations of a weak *in vitro* interaction between the two proteins suggest that KCC3 and CK-B may interact mainly in a transient manner. Indeed, we failed to efficiently co-immunoprecipitate the two proteins (data not shown), even though we could observe protein colocalization by double immunofluorescence on fixed KCC3 transfected HeLa cells. To further support this observation of a KCC3/CK-B interaction, we observed that the least deleterious HMSN/ACC-associated truncation abolishes the interaction between the two proteins. Even though CK-B is a cytosolic protein, its association with membrane proteins has been repeatedly demonstrated, its interactors including receptors (thrombin receptor, PAR-1; Mahajan et al. 2000) or channels (ATP-sensitive K⁺ channel; Crawford et al. 2002). Therefore, as a membrane-associated protein, CK-B is considered to be important for producing the ATP required for ion-driving protein activity. These results are consistent with a previous study showing the requirement of creatine kinase for swelling-activated potassium-chloride co-transport in red blood cells (12). However, the functional significance of the interaction between KCC3 and CK-B remains unclear and the action of ATP on the potassium-chloride co-transporters' function is very complex. Other groups

have either demonstrated an ATP-induced activation of KCCs (20, 21), or have documented that a decrease in ATP levels and the related Mg^{2+} depletion effect was linked to KCC's activation, although ATP was required for the full stimulation of the co-transporters (22), making this a controversial aspect of KCC3's regulation. We show here that CK-B activity is required for the proper functioning of KCC3, which further supports the hypothesis that ATP is necessary for KCC3 activation. Interestingly, the activity of KCC proteins seems to be modulated by phosphorylation involving kinases and phosphatases (23, 24). CK-B's role could therefore be to provide the necessary ATP to specific kinases, which in turn physically interact with KCC3. Alternatively, CK-B itself could be responsible for the direct phosphorylation of KCC3 (25).

The swelling-regulation machinery depends on intracellular and extracellular ATP availability (26, 27). It was shown that ATP removal by apyrase inhibits cell volume restoration under hypotonic stress in several cell types (i.e. astrocytes, hepatocytes, airway and intestinal cells and pancreatic acinar cells) (28-31). Hypotonic-swelling stimulates the release of extracellular ATP, which then acts as an autocrine/paracrine factor to increase membrane permeability to ions and osmolites (27, 32). The action of ATP is ultimately to decrease the cell volume (33). More specifically, it has been reported that in the nervous system an astrocytic ATP release allows a paracrine signaling to neurons, which are known to have low CK-B, leading to a reduction of the neuronal volume (34, 35). In addition, characteristics of necrotic swelling of nerve cells include a deleterious volume increase of the cells associated with a rapid ATP depletion (36). Given the central role of ATP in nerve cell volume regulation, ATP trafficking is likely to play a key role in controlling cell volume decrease in the nervous system.

Solute carriers, along with volume-regulated channels, control the responses involved in cell volume regulation and ion distribution. Among the members of the SLC12 family of proteins, NKCC1 and KCC2 seem to play the most pivotal roles in both neuronal development and functioning (4), but neither one of them is involved in the regulatory volume decrease (RVD) response in neurons. In contrast, KCC3 is activated under

hypotonic conditions to induce the RVD response, which is greatly impaired in HMSN/ACC patients (2, 9). Volume adaptation to osmotic stress and management of ion distribution are primary or secondary active mechanisms that are highly energy-demanding. In nerve and glial cells, because of their distinctive shape and of the constant intracellular and environmental challenges in ion distribution, energy requirements need to be fine-tuned to an even greater extent. An important amount of energy is also required during nervous system development, given the tasks of elongating and orientating axons, while correct myelin ensheathment occurs. Therefore, an adequate energy supply is of crucial importance for osmotic-dependant integrity of neurons, but is also essential for the proper development of the nervous system. Taking all these observations together, a potential prominent role emerges for the interaction of KCC3 with CK-B, which, when abrogated, could be a major contributor to the neurological defects observed in HMSN/ACC patients. The elucidation and characterization of this protein-protein interaction could, therefore, lead to the better understanding of the pathological mechanisms of HMSN/ACC and ultimately lead to the development of therapies and improved patient management.

Materials and methods

Constructs

The construct containing the full-length KCC3 cDNA in the pGEM vector was kindly provided by Dr. David Mount (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). To allow the expression of KCC3 protein in mammalian cells, the full-length cDNA in pGEM was digested with SacII and EcoRI and subcloned into the pcDNA 3.1C vector (Invitrogen). Site-directed mutagenesis was performed using appropriate primers to produce the 3031C→T transition, which is the least deleterious KCC3 truncation characterized so far (R1011X mutant protein). The whole KCC3 C-terminal domain (CTD) was amplified using 5'-GGATCCGTCGACTCGATGGTATCCGTGGGCTGGT-3' and 5'-ATGCGGCCGCTCTAGAGAATTCAGAGTAGGTTAT-3' primers, containing BamHI and NotI cloning sites in-frame. The PCR fragment was purified, restriction enzyme digested with BamHI and NotI and cloned into the corresponding sites into the pGEX 3T-1 vector (Amersham), which allows the production of GST-fused proteins.

For Y2H experiments, CK-B cDNA was purchased from MGC library (IMAGE: 4135106) and Gateway recombination cloning system-compatible primers (5'-CACCATGCCCTTCTCCAACAGCCATAATACGCAG-3' and 5'-CTTCTGGGCCGGCATGAGGTCATCGATTGC-3') were used to amplify its cDNA. KCC3's whole CTD and distal CTD sequences coding for the last 140 amino acids of KCC3 were amplified using appropriate Gateway recombination cloning system-compatible primers (5'-CACCGAGGCACAATTGGTGAAAG-3' and 5'-CTTCTGGGCCGGCATGAGGTCATCGATTGC-3', respectively). The CK-B and KCC3's PCR products were first cloned into the pENTR entry vector (Invitrogen) and sequence accuracy was confirmed by sequencing. The CK-B fragment was then subcloned into Gateway-compatible vector pDEST-22 containing a 3'-GAL4 activation domain, and KCC3's fragments were subcloned into pDEST-32, which contains 3'-GAL4 DNA binding

domain. Subcloning by recombination with LR-recombinase (Invitrogen) was performed according to the manufacturer's instructions.

Yeast two-hybrid

Chemically competent yeast MaV203 cells (MAT α ; leu2-3,112; trp1-901; his3 Δ 200; ade2-101; cyh2R; can1R; gal4 Δ ; gal80 Δ ; GAL1::lacZ; HIS3UASGAL1::HIS3@LYS2; SPAL10::URA3) were co-transformed with the bait plasmid, which carried the LEU2 marker, and the prey plasmid carrying the TRP1 marker. No self-activation of the bait and the prey strain reporter genes was obtained on synthetic drop-out (SD)–Ura/His medium. Transformed yeast cells were grown on SD–Leu/Trp plates for selection of co-transformed cells. Colonies were picked onto SD–Leu/Trp/His plates for assessment of interactions. Activation of the LacZ reporter was assayed by growing the yeast on filter paper on YPAD plates overnight, lysing the cells in liquid nitrogen and then incubating the filter papers at 37 °C for 1h on filters pre-soaked in 100 μ l 10% X-gal. 60 μ l β -mercaptoethanol and 10ml Z buffer (100mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, pH 7).

In vitro binding assay

The CTD of KCC3 cloned in pGEX was propagated in the bacterial strain BL21. A single colony was incubated in a 3ml culture of LB (containing 100 μ g/ml ampicillin), grown overnight at 37 °C and used to produce large-scale cultures. Large-scale cultures were grown until OD_{600nm}=0.6–0.8 at 30 °C and incubated with 0.1mM IPTG for an additional 30 min to 2h at 30 °C. The expression of the fusion protein was assessed by Western blot using a GST-specific antibody. The fusion protein was purified using standard procedures with 500 μ l of 50% slurry glutathione-sepharose beads (Amersham). The binding assays were performed for 1 hour at 4 °C in 500 μ l of binding solution containing a total brain protein extract under rocking movement. Following incubation, the beads were

rinsed three times for 1 hour at 4 °C in a modified RIPA buffer and carefully drained. The dried beads containing the bound complexes were sent to Wemb Biochem Inc. (Toronto) for protein sequencing using an LC-MS protocol. In parallel, the beads containing the purified complexes were dissociated by boiling for 10 min in sample buffer. The unbound complexes were finally loaded on an SDS-PAGE gel and stained with coomassie blue to assess protein integrity.

Antibodies

Monoclonal anti-GST primary antibody was obtained from Clontech. Monoclonal and polyclonal anti-CK-B primary antibodies were obtained from OEM concept. Polyclonal anti-KCC3 primary antibody, which recognizes the N-terminal domain of the transporter was obtained from Abnova. Peroxidase-conjugated secondary antibodies for Western blotting were obtained from the Jackson Labs. Secondary antibodies for immunofluorescence were obtained from the Jackson Labs.

HeLa cell transfection and immunocytochemistry

HeLa cells were seeded on sterile plastic coverslips in six-well plates and transfected with 4µg of full-length KCC3 or R1011X vector DNA using lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Following transfection, cells were incubated for 24h in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO) containing 10% fetal bovine serum (FBS), then washed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 10 min. Fixed cells were washed in PBS before being permeabilized in PBS containing 0,2% Triton X-100 (Sigma) at room temperature for 10 min. Permeabilized cells were then washed in PBS, incubated for 1h in blocking solution (10% NGS in PBS) and transferred to a 5% NGS in PBS solution containing CK-B (OEM concept) and KCC3 (Abnova) antibodies at an appropriate dilution (1:100 and 1:200, respectively). After an overnight incubation, coverslips were washed in

PBS and were then incubated for 60 min in 5% NGS in PBS containing fluorescent secondary antibodies. The coverslips were finally washed in PBS and mounted for fluorescent microscopy or confocal visualisation.

Mouse brain preparation and immunohistochemistry

Mouse brains fixed in 4% paraformaldehyde were embedded in Tissue-Tek, sectioned parasagittally (10 μ m) and placed on glass slides. The sections were processed for immunohistochemistry using a standard protocol (Gaspar et al. 2000). After permeabilization and blocking steps, the sections were incubated overnight in 5% NGS in PBS containing KCC3 and CK-B antibodies (1:150 and 1:200, respectively) and revealed by a 1 hour incubation with fluorescent secondary antibodies, followed by slide mounting for confocal microscopy.

Flux assay

In vitro cRNA transcription.

The pGEMHE templates were linearized downstream from the 3'-end of coding sequence with NotI, and the cRNAs were transcribed in vitro using T7 RNA polymerase. Transcript integrity was verified on agarose gels, and concentration was evaluated by absorbance reading at 280 nm and by densitometric analysis of the corresponding band in ethidium bromide-stained gels.

Xenopus laevis oocyte preparation.

Xenopus laevis oocytes were surgically harvested from anesthetized adult female animals and defolliculated at room temperature for 2 hours with 2 mg/ml collagenase A. Stage V and VI healthy oocytes were injected with 50 nl of water with or without cRNA (total KCC3 cRNA injected was 10ng/oocyte and total CK-B cRNA injected was 4,6ng/oocyte). After injection, oocytes were incubated at 18°C for 5 days in Barth's

solution (90 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.82 mM MgCl₂, 0.74 mM CaCl₂, 10 mM HEPES/Tris, 5% (v/v) horse serum, pH 7.6) to allow for recovery and protein expression.

Assessment of KCC3 function.

The activity of KCC3 was determined by assessing ⁸⁶Rb⁺ uptake in groups of 20 oocytes or more. The uptake was measured at 32 °C using a standard protocol: a 60 min incubation period in a hypotonic medium (52 mM Na-Cyclamate, 3.3 mM KCl, 0.74 mM CaCl₂, 0.82 mM MgCl₂, 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4) with 10 μM ouabain, was followed by an incubation in an uptake medium containing 49 mM NaCl, 15 mM Na-Cyclamate, 0.74 mM CaCl₂, 0.82 mM MgCl₂, 10 mM HEPES/Tris, pH 7.4, 5 mM ⁸⁶Rb⁺-Cl⁻ and 10 μM ouabain. The KCC3-dependant uptake of ⁸⁶Rb⁺ was deduced by exposing groups of cRNA-injected oocytes to 1mM furosemide. The KCB-dependant uptake was deduced by exposition to 50μM to 200μM of 2,4-Di-Nitro Fluoro Benzene (DNFB). The uptake experiment was stopped after 45 min by five washes in ice-cold uptake solution without the isotope, to remove extracellular fluid tracer. The oocytes were lysed in 10% sodium dodecyl sulfate and tracer activity was measured for 2 min in a liquid scintillation counter.

Statistical analysis.

Statistical significance was defined as p<0,01, and the results were presented as means +/-SE. The significance of the differences between oocyte groups was tested by one-way *ANOVA* and two-tailed Student t-test.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR grant #172248) and the “Fondation des jumelles Coudé”.

Figure legends

Figure 1. Sequence analysis and conservation of the most distal 140 amino acids of KCC3.

The non-conserved residues are indicated in red. The different shades of blue correspond to different levels of conservation between the different KCCs.

Figure 2. Y2H evidence of interaction between CK-B and the CTD of KCC3.

(a) CK-B interacts with KCC3's CTD in Y2H experiments. The third column shows growth of co-transformants on medium lacking tryptophane and leucine (-L/W) to select for the presence of both bait and prey vectors. The positive interaction was revealed by the growth of the colonies on medium lacking tryptophane, leucine and histidine (-L/W/H), which requires the activation of the His reporter gene for the acquisition of histidine auxotrophy. (b) β -galactosidase assay confirms the Y2H interaction. Yeast cells were transferred to filters and tested for activation of the the β -galactosidase reporter gene. Co-transformed yeast cells containing KCC3 and a non-specific prey protein (NSP) show absence of blue coloration upon β -galactosidase assay, whereas cells containing KCC3's CTD and CK-B show a positive but weak β -galactosidase activity. The whole CTD of human KCC3 (amino acids 669-1150; KCC3 in the figure) was used as the 'bait' protein while human CK-B was used as 'prey'.

Figure 3. Evidence of interaction between endogenously expressed CK-B and the CTD of KCC3 by GST-pull down.

(a) Assessment of GST-KCC3 CTD in vitro expression. The column corresponds to E. coli extract expressing GST-tagged CTD of KCC3 and adequate expression was visualized with an anti-GST antibody. (b) Assessment of the endogenous expression of CK-B in the brain. The panel corresponds to a total mouse brain extract and the expression of CK-B is

revealed by a specific anti-CK-B antibody (c) Detection of GST-pulled down complexes. Glutathione-sepharose beads, GST only or the fusion protein were incubated with the total mouse brain extract, which contains endogenously expressed CK-B. The resultant bound proteins were revealed on an SDS-page gel with coomassie blue. Molecular weight markers (in kDa) are shown. (d) Identification of CKB protein by LC-MS/MS. MS2 spectra of a CK-B peptide (each labeled peak corresponds to an amino acid of an internal peptide sequence of CK-B: LGFSEVELVQMVDGVK). The red peaks indicate matched b-ion series, the blue peaks indicate matched y-ion series, and the black peaks indicated unmatched ions. The majority of peaks are matched in agreement with a high cross-correlation score and correspond to mouse CK-B.

Figure 4. KCC3 and CK-B colocalization.

(a) Co-expression of endogenously expressed KCC3 (in green) and CK-B (in red) in cells of the mouse brain, revealed by immunofluorescence using specific antibodies. (b) Western blot analysis of KCC3 in transfected HeLa cells: the first lane shows the endogenous expression of KCC3 in mock-transfected cells and the second lane shows adequate KCC3 expression in the transiently transfected cells, using a specific KCC3 antibody. (c) Western blot analysis of CK-B in transfected HeLa cells: the column shows the expression of endogenously expressed CK-B. (d) Confocal microscopy observation of CK-B and KCC3 colocalization in HeLa cells. Localization of endogenous CK-B and transiently transfected wild-type KCC3 in HeLa cells revealed by double immunofluorescence using specific CK-B (in red) and KCC3 (in green) antibodies. Yellow staining corresponds to the colocalization of the two proteins.

Figure 5. Impairment of CK-B's interaction with KCC3 by HMSN/ACC KCC3 truncating mutations.

(a) Whole (amino acids 669-1150) and distal (amino acids 1011-1150) regions of human KCC3 CTD were used as baits in the Y2H assay. Human CK-B was used as the prey protein. The interaction between CK-B and both CTD fragments was revealed by the acquisition of histidine auxotrophy of the transformed yeast cells grown on media lacking tryptophane, leucine and histidine (-L/W/H). (b) Schematic diagram representing C-terminal fragments of KCC3 used in the yeast two-hybrid experiments. (c) Western blot analysis confirms expression of wild-type (middle lane) and truncated KCC3 (right lane) in transiently transfected HeLa cells. Western blot of the mock-transfected HeLa cells is shown on the left lane. The upper bands, seen above the truncated KCC3, correspond to the endogenously expressed KCC3 in HeLa cells. (d) Comparison of colocalization of CK-B with wild-type (upper panels) or mutant R1011X (lower panels) KCC3 forms in transiently transfected HeLa cells. Double immunofluorescent labeling of KCC3 (green) and CK-B (30) shows a loss of colocalization of the truncated KCC3 and CK-B.

Figure 6. Functional impact of CK-B's interaction with KCC3 in *Xenopus laevis* oocyte flux assay.

(a) Immunofluorescent analysis of KCC3 availability at the membrane of *Xenopus laevis* oocytes (16X magnification). KCC3 immunostaining of 10 μm -thick cryosections of: a water-injected oocyte as a control, stained with CK-B antibody (upper-left panel), a water-injected oocyte stained with KCC3 antibody (lower-left panel), a KCC3-injected oocyte stained with anti-KCC3 antibody (upper-right panel) and a CK-B-injected oocyte stained with CK-B antibody (lower-right panel) (each representative of 10 stainings). Note that CK-B antibody raised against the human form shows low affinity for CK-B endogenously expressed in *Xenopus laevis*. (b) Assessment of KCC3's flux dependant of CK-B activity. Measurements of $^{86}\text{Rb}^+$ uptake invoked under hypotonic conditions in a representative experiment in *Xenopus laevis* oocytes injected with the wild-type KCC3 cRNA with or without co-expression of exogenous CK-B, CK-B cRNA only or water. All

of the values shown are expressed as mean flux rates \pm S.E. of 13–21 oocytes and * indicates that the corresponding value is significantly different ($p < 0,01$) relative to flux rates of KCC3 without inhibitor; # indicates a moderate significance ($0,05 < p < 0,01$). Wild-type KCC3 activation mediated a significant $^{86}\text{Rb}^+$ transport, which was fully abolished by 1mM furosemide, as well as by 50 μM of DNFB, a specific inhibitor of CK-B. Note that 200 μM DNFB did not affect the intracellular distribution of wild-type KCC3 in the immunofluorescence studies of Figure 5d. (c) Quantitative assessment of CK-B protective effect over the DNFB-dependant inhibition of KCC3 activity. The values shown are normalized with the flux rates without DNFB \pm S.E. of 12-25 oocytes among 4–7 different experiments, and the * indicates that the corresponding value is significantly different ($p < 0,01$) relative to the KCC3 + 1mM furosemide value. The mean value of KCC3 + 1mM furosemide flux rate is indicated by a dashed line. 50 μM of DNFB was sufficient to significantly inhibit the KCC3-driven furosemide-sensitive flux of $^{86}\text{Rb}^+$. A minimum of 200 μM of DNFB was required to abolish KCC3's activity when CK-B was co-overexpressed in the oocytes.

Figure 1.



Figure 2.

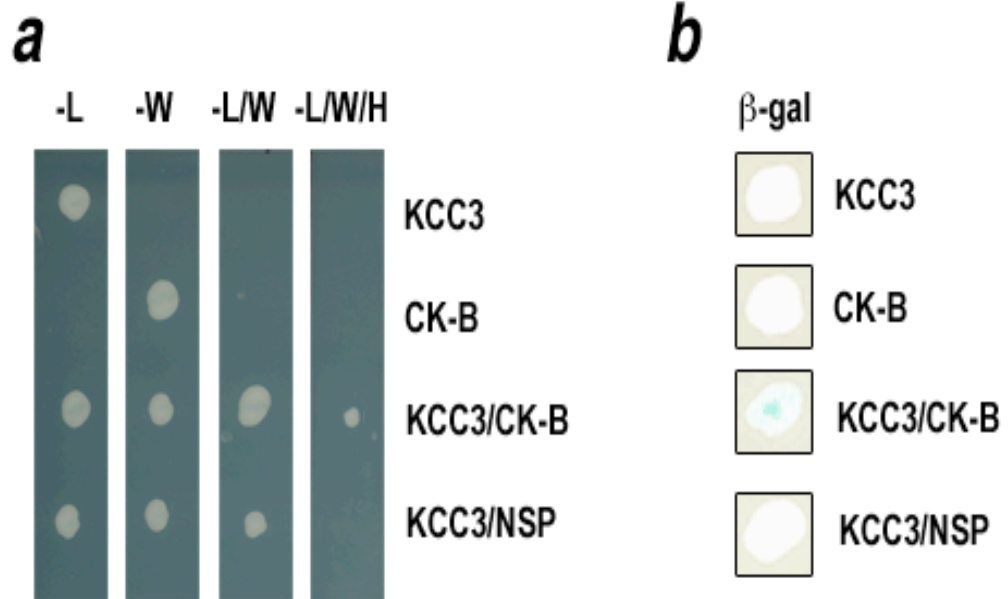


Figure 3.

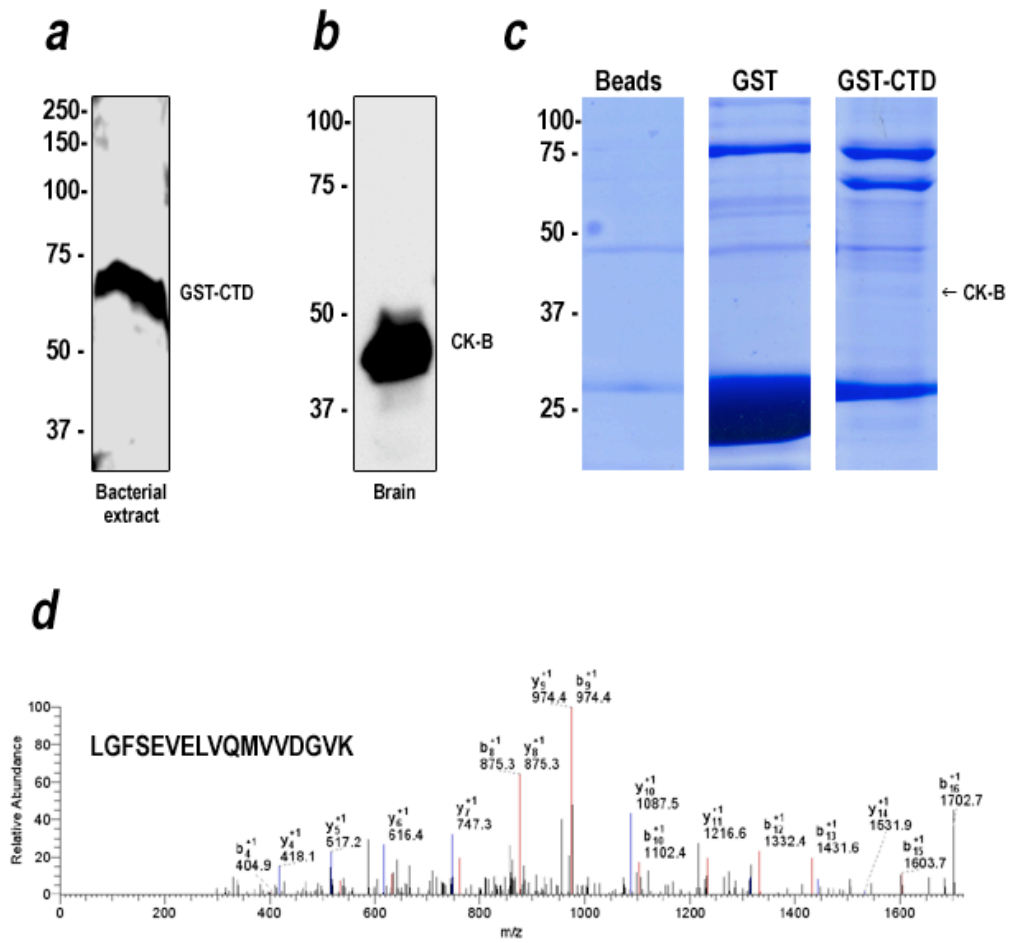


Figure 4.

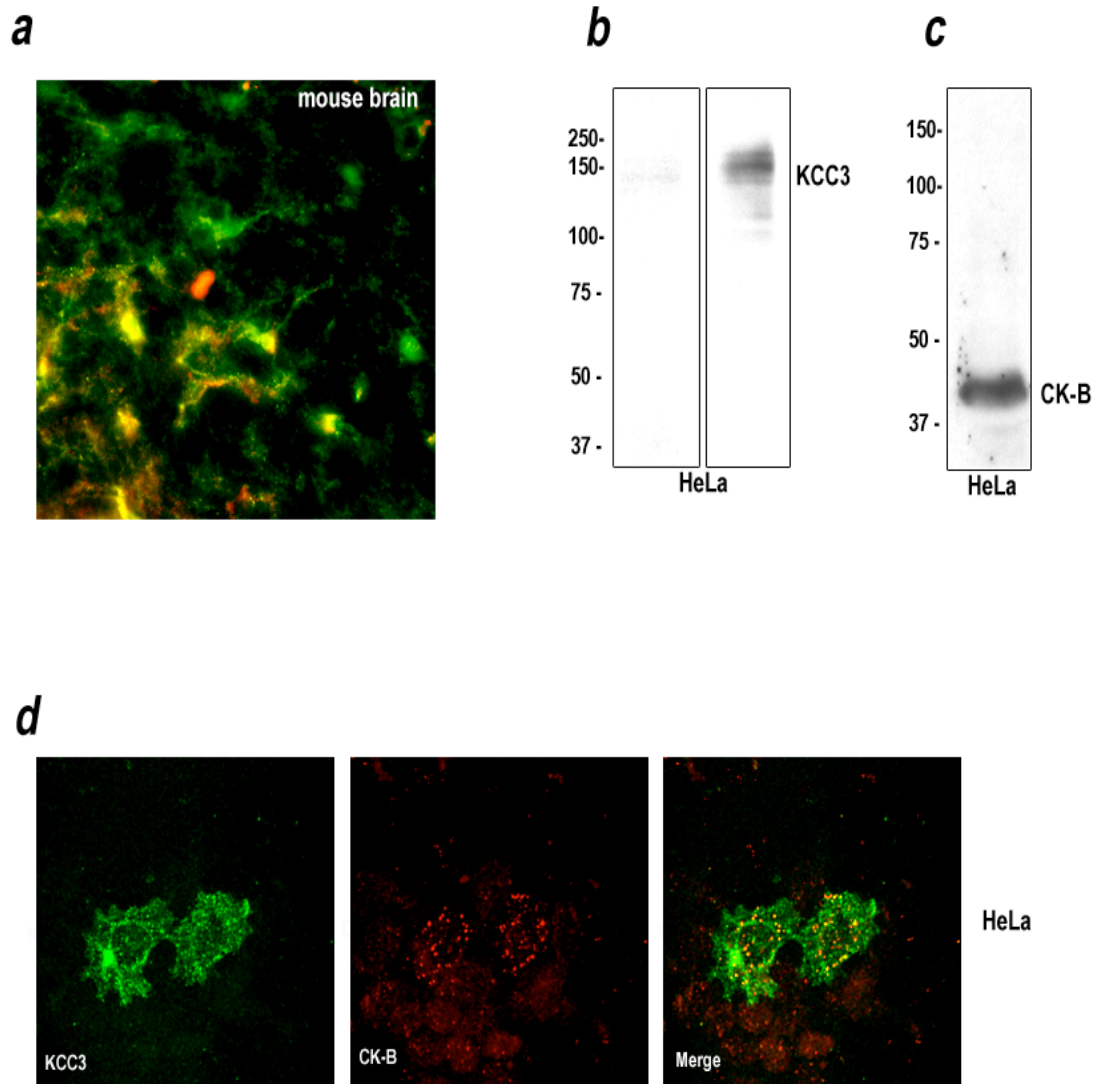


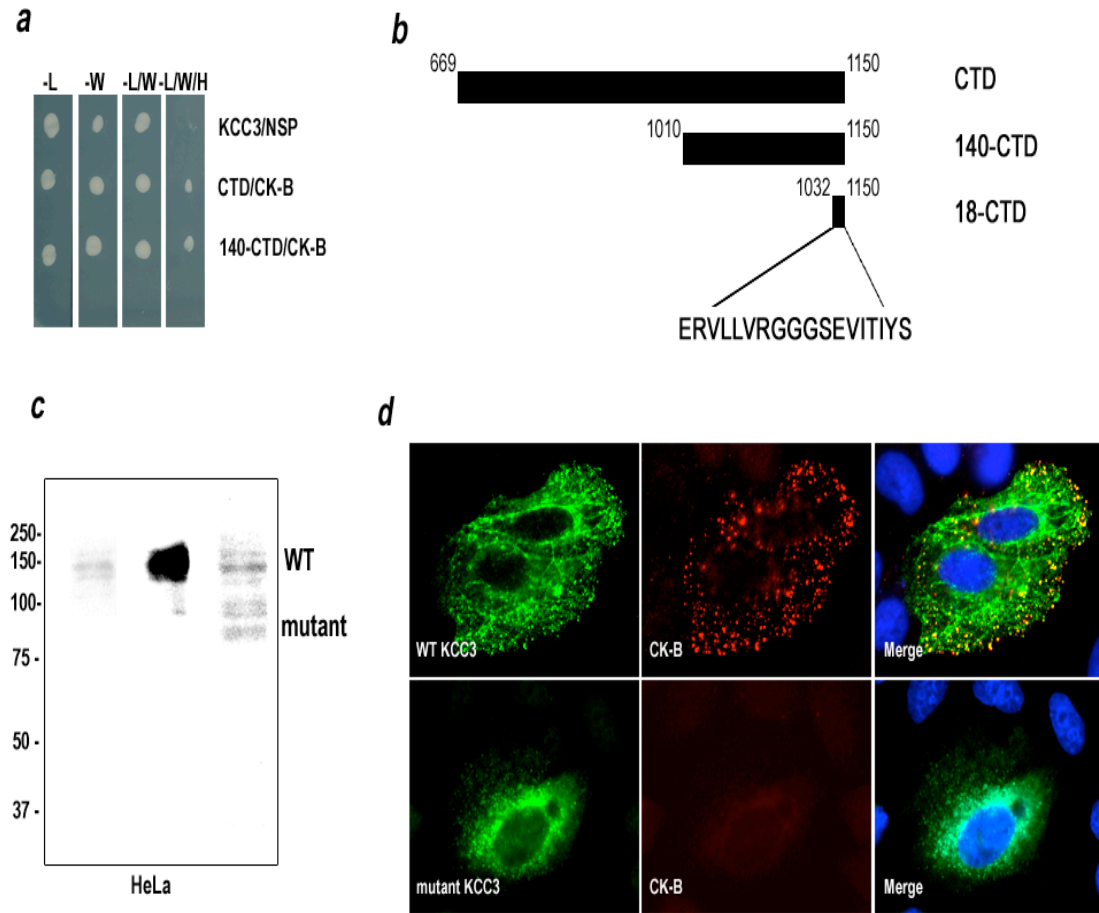
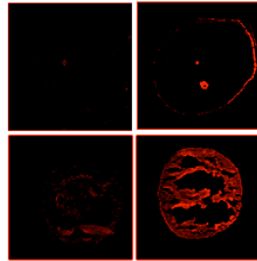
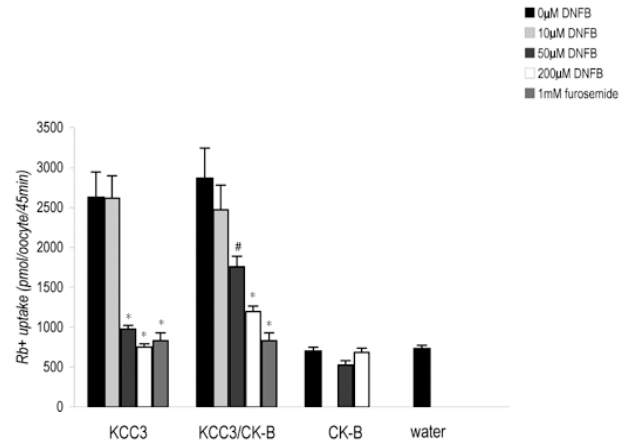
Figure 5.

Figure 6.

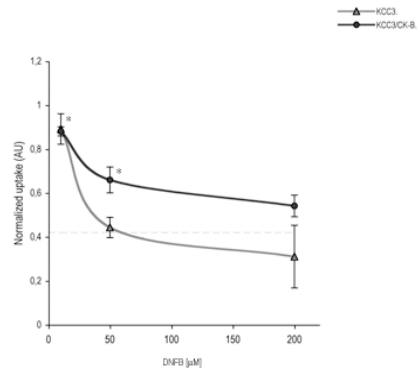
a



b



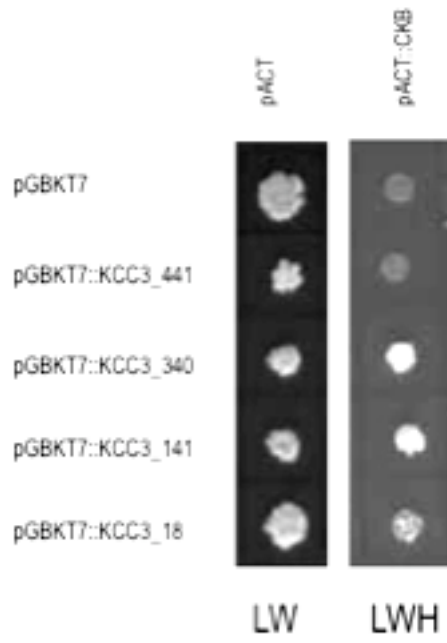
c



Supplementary data

Figure E. Interaction of C-terminal fragment of KCC3 with CKB in yeast two-hybrid tests.

We subcloned cDNAs fragments encoding human fragments of KCC3's CTD into the pGBKT7 Gal4 DNA-binding domain bait vector (Clontech) and full CK-B cDNA into pGADT7 Gal4 DNA-activating domain prey vector (Clontech). AH109 yeast cells were transformed with pGBKT7 encoding C-terminal KCC3 amino acids. A yeast two-hybrid test was performed by mating transformed bait AH109 yeast cells with prey Y187 yeast cells. Diploid clones were grown on minimal medium lacking Leu, Trp, and His. The last 441 (KCC3_441), 340 (KCC3_340), 141 (KCC3_141) or 18 (KCC3_18) amino acids of KCC3 were tested for interaction with full-length CK-B. In plate assays with selective medium lacking Leu (L), Trp (W), and His (H), the C-terminal part of KCC3 was able to interact with CK-B. No interaction was detected with the Gal4-binding domain alone. (Clontech Matchmaker Two Hybrid)

Figure E.

References

1. Dupre, N., Howard, H.C., Mathieu, J., Karpati, G., Vanasse, M., Bouchard, J.P., Carpenter, S. and Rouleau, G.A. (2003) Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann. Neurol.*, 54, 9-18.
2. Howard, H.C., Mount, D.B., Rochefort, D., Byun, N., Dupre, N., Lu, J., Fan, X., Song, L., Riviere, J.B., Prevost, C. et al. (2002) The K-Cl co-transporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat. Genet.*, 32, 384-392.
3. Mount, D.B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A.L., Jr., Delpire, E. and Gamba, G. (1999) Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride co-transporter gene family. *J. Biol. Chem.*, 274, 16355-16362.
4. Hebert, S.C., Mount, D.B. and Gamba, G. (2004) Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ co-transport: the SLC12 family. *Pflugers Arch.*, 447, 580-593.
5. Hiki, K., D'Andrea, R.J., Furze, J., Crawford, J., Woollatt, E., Sutherland, G.R., Vadas, M.A. and Gamble, J.R. (1999) Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ co-transporter. *J. Biol. Chem.*, 274, 10661-10667.
6. Mercado, A., Vazquez, N., Song, L., Cortes, R., Enck, A.H., Welch, R., Delpire, E., Gamba, G. and Mount, D.B. (2005) NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ co-transporter. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 289, F1246-1261.
7. Race, J.E., Makhlof, F.N., Logue, P.J., Wilson, F.H., Dunham, P.B. and Holtzman, E.J. (1999) Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl co-transporter. *Am. J. Physiol.*, 277, C1210-1219.
8. Uyanik, G., Elcioglu, N., Penzien, J., Gross, C., Yilmaz, Y., Olmez, A., Demir, E., Wahl, D., Scheglmann, K., Winner, B. et al. (2006) Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology*, 66, 1044-1048.

9. Salin-Cantegrel, A., Riviere, J.B., Dupre, N., Charron, F.M., Shekarabi, M., Karemera, L., Gaspar, C., Horst, J., Tekin, M., Deda, G. et al. (2007) Distal truncation of KCC3 in non-French Canadian HMSN/ACC families. *Neurology*, 69, 1350-1355.
10. Inoue, K., Ueno, S. and Fukuda, A. (2004) Interaction of neuron-specific K⁺-Cl⁻ co-transporter, KCC2, with brain-type creatine kinase. *FEBS Lett.*, 564, 131-135.
11. Inoue, K., Yamada, J., Ueno, S. and Fukuda, A. (2006) Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2. *J. Neurochem.*, 96, 598-608.
12. Colclasure GC, Parker JC, Dunham PB. (1995) Creatine kinase is required for swelling-activated K-Cl co-transport in dog red blood cells. *Am. J. Physiol.* 268, 660-668
13. Wyss, M. and Kaddurah-Daouk, R. (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.*, 80, 1107-1213.
14. Song, L., Mercado, A., Vazquez, N., Xie, Q., Desai, R., George, A.L., Jr., Gamba, G. and Mount, D.B. (2002) Molecular, functional. and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl co-transporter. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 103, 91-105.
15. Mercado, A., Broumand, V., Zandi-Nejad, K., Enck, A.H. and Mount, D.B. (2006) A C-terminal domain in KCC2 confers constitutive K⁺-Cl⁻ co-transport. *J. Biol. Chem.*, 281, 1016-1026.
16. Tachikawa, M., Fukaya, M., Terasaki, T., Ohtsuki, S. and Watanabe, M. (2004) Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glial relationship for brain energy homeostasis. *Eur. J. Neurosci.*, 20, 144-160.
17. Pearson, M.M., Lu, J., Mount, D.B. and Delpire, E. (2001) Localization of the K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ co-transporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience*, 103, 481-491.

18. Mahajan, V.B., Pai, K.S., Lau, A. and Cunningham, D.D. (2000) Creatine kinase, an ATP-generating enzyme, is required for thrombin receptor signaling to the cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 97, 12062-12067.
19. Crawford, R.M., Ranki, H.J., Botting, C.H., Budas, G.R. and Jovanovic, A. (2002) Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel in vivo. *Faseb J.*, 16, 102-104.
20. Lauf, P.K. (1983) Thiol-dependent passive K⁺-Cl⁻ transport in sheep red blood cells. V. Dependence on metabolism. *Am. J. Physiol.*, 245, C445-448.
21. Lauf, P.K., Bauer, J., Adragna, N.C., Fujise, H., Zade-Oppen, A.M., Ryu, K.H. and Delpire, E. (1992) Erythrocyte K-Cl co-transport: properties and regulation. *Am. J. Physiol.*, 263, C917-932.
22. Ortiz-Carranza, O., Adragna, N.C. and Lauf, P.K. (1996) Modulation of K-Cl co-transport in volume-clamped low-K sheep erythrocytes by pH, magnesium, and ATP. *Am. J. Physiol.*, 271, C1049-1058.
23. Adragna, N.C., Di Fulvio, M. and Lauf, P.K. (2004) Regulation of K-Cl co-transport: from function to genes. *J. Membr. Biol.*, 201, 109-137.
24. Bergeron, M.J., Gagnon, E., Caron, L. and Isenring, P. (2006) Identification of key functional domains in the C terminus of the K⁺-Cl⁻ co-transporters. *J. Biol. Chem.*, 281, 15959-15969.
25. Hemmer, W., Furter-Graves, E.M., Frank, G., Wallimann, T. and Furter, R. (1995) Autophosphorylation of creatine kinase: characterization and identification of a specifically phosphorylated peptide. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1251, 81-90.
26. Wang, Y., Roman, R., Lidofsky, S.D. and Fitz, J.G. (1996) Autocrine signaling through ATP release represents a novel mechanism for cell volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 93, 12020-12025.

27. Dubyak, G.R. and el-Moatassim, C. (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am. J. Physiol.*, 265, C577-606.
28. Mongin, A.A. and Kimelberg, H.K. (2005) ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca²⁺-sensitive mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 288, C204-213.
29. Feranchak, A.P., Fitz, J.G. and Roman, R.M. (2000) Volume-sensitive purinergic signaling in human hepatocytes. *J. Hepatol.*, 33, 174-182.
30. Dezaki, K., Tsumura, T., Maeno, E. and Okada, Y. (2000) Receptor-mediated facilitation of cell volume regulation by swelling-induced ATP release in human epithelial cells. *Jpn. J. Physiol.*, 50, 235-241.
31. Okada, S.F., Nicholas, R.A., Kreda, S.M., Lazarowski, E.R. and Boucher, R.C. (2006) Physiological regulation of ATP release at the apical surface of human airway epithelia. *J. Biol. Chem.*, 281, 22992-23002.
32. Feranchak, A.P., Roman, R.M., Schwiebert, E.M. and Fitz, J.G. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to cell volume regulation through effects on ATP release. *J. Biol. Chem.*, 273, 14906-14911.
33. Franco, R., Panayiotidis, M.I. and Ochoa de la Paz, L.D. (2008) Autocrine signaling involved in cell volume regulation: The role of released transmitters and plasma membrane receptors. *J. Cell. Physiol.*
34. Joseph, S.M., Buchakjian, M.R. and Dubyak, G.R. (2003) Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J. Biol. Chem.*, 278, 23331-23342.
35. Queiroz, G., Meyer, D.K., Meyer, A., Starke, K. and von Kugelgen, I. (1999) A study of the mechanism of the release of ATP from rat cortical astroglial cells evoked by activation of glutamate receptors. *Neuroscience*, 91, 1171-1181.

36. Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J. and Morishima, S. (2001) Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J. Physiol.*, 532, 3-16.

Article 3

Identification des différents mécanismes d'inactivation de KCC3 dans le syndrome NSMH/ACC

L'article précédent laissait suggérer que l'interaction fonctionnelle entre CK-B et le C-terminus de KCC3 était en cause de façon systématique. Ceci mettait le C-terminus au centre de la pathogenèse du syndrome. Dans le but de raffiner l'étendue des régions d'interactions qui sont importantes à la fonction du cotransporteur, nous avons poursuivi le recrutement de nouveaux patients à travers le monde afin d'identifier de nouvelles mutations à l'impact minimal sur la séquence peptidique de KCC3. Cependant, l'identification en 2006 d'une première mutation faux-sens à l'origine de la NSMH/ACC a laissé suggérer qu'il existe des pathomécanismes distincts d'inactivation de KCC3. Nous avons donc aussi cherché à identifier des pathomécanismes complémentaires qui n'impliqueraient pas de façon directe le domaine C-terminus.

Cette étude a eu pour intérêt de confirmer que la perte de fonction de KCC3 est nécessaire pour mener aux manifestations de la maladie, puisque toutes les mutations étudiées inactivent d'une façon ou d'une autre le co-transporteur. Ce travail a aussi accessoirement confirmé que l'interaction protéique KCC3/CK-B fait défaut dans la grande majorité des cas (mutations tronquantes) et est de ce fait un mécanisme important pour l'inactivation de KCC3. De plus, nous sommes parvenu à identifier un nouveau mécanisme d'inactivation de KCC3 (et des SLC12) ce qui amène de nouvelles possibilités thérapeutiques.

L'essentiel de ce travail fait partie d'un manuscrit en demande de corrections mineures pour *J Biol Chem* et intitulé : 'Transit defect of KCC3 is a major pathogenic mechanism in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum'.

Implication des auteurs :

Salin-Cantegrel A : stratégie expérimentale, expériences, analyse des résultats et rédaction intégrale de l'article.

Rivière J-B : séquençage génomique et coopération sur le projet

Shekarabi M : discussion sur l'article et coopération sur le projet.

Rasheed S : support technique

DaCal S, Laganière J, Rebecca G, Daniel Rochefort : assistance technique

Gaspar C, Patrick D : correction du manuscrit

Lapointe J-Y : expertise en étude de flux

Rouleau GA: supervision et direction générale et correction finale du manuscrit

TITLE PAGE**Transit defect of KCC3 is a major pathogenic mechanism in hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum**

Adèle Salin-Cantegrel¹, Jean-Baptiste Rivière¹, Masoud Shekarabi¹, Sarah Rasheed¹, Sandra DaCal³, Janet Laganière¹, Rébecca Gaudet¹, Daniel Rochefort¹, Claudia Gaspar^{1, 2}, Patrick A. Dion^{1, 2}, Jean-Yves Lapointe³, Guy A. Rouleau^{1, 4*}

¹ Centre of Excellence in Neuromics of University of Montreal, CHUM Research Center, Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada.

² Centre of Excellence in Neuromics of University of Montréal, CHUM Research Center, Montreal, Quebec, H2L 4M1, Canada.

³ Department of physics - University of Montreal, Montreal, H3C 3J7, Canada.

⁴ Department of Medicine, University of Montreal.

*Corresponding author:

ABSTRACT

Missense and protein truncating mutations of the human potassium-chloride cotransporter 3 gene (*SLC12A6* or *KCC3*) cause hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC), which is a severe neurodegenerative disease characterized by axonal dysfunction and neurodevelopmental defects. We previously reported that *KCC3* truncating mutations disrupt brain-type creatine kinase (CK-B)-dependent activation of the cotransporter through the loss of its last 140 AA. Here, we report a novel and more distal HMSN/ACC truncating mutation (3402C→T; R1134X) that eliminates only the last 17 residues of the protein. This small truncation disrupts the interaction with CK-B in mammalian cells but also affects plasma membrane localization of the mutant transporter. The previously reported HMSN/ACC-causing 619C→T; R207C missense mutation also leads to *KCC3* loss of function in *Xenopus* oocytes flux assay. Immunodetection in *Xenopus* oocytes and in mammalian cultured cells revealed a decreased amount of R207C at the plasma membrane, with significant retention of the mutant proteins in the endoplasmic reticulum (ER). In mammalian cells, curcumin partially corrected these mutant protein mislocalizations, with more protein reaching the plasma membrane. These findings suggest that mistrafficking of mutant protein may be an important pathophysiological feature of HMSN/ACC causative *KCC3* mutations.

INTRODUCTION

Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC; OMIM 218000) is a severe and progressive early onset motor and sensory neuropathy of that is characterized by axonal swelling and is associated with neurodevelopmental defects in the central nervous system (CNS) (1). This autosomal recessive neuropathy is caused by mutations in the potassium-chloride cotransporter 3 (*SLC12A6* or *KCC3*) gene (2). However, cation-chloride co-transporter (CCC)-related diseases are mainly metabolic disorders that include Gitelman's disease, which is caused by mutations in the *SLC12A3* or *NCC* gene (OMIM 2638000), and Bartter's disease, which is caused by mutations in the *SLC12A1* or *NKCC2* gene (OMIM 601678).

CCCs share a structure of twelve membrane-spanning segments, which constitute a hydrophobic and glycosylated core, flanked by cytosolic amino- and carboxy-terminal domains. Many pathomechanisms have been proposed to explain the inactivation of NCC and NKCC2 in Gitelman's and Batter's diseases, respectively; these include anomalies in the biosynthesis, processing, trafficking, conductance, regulation, and degradation of the mutant proteins (see Gamba et al. 2006, for review) (3); however, little is known about the pathomechanisms underlying KCC3 dysfunction in HMSN/ACC.

Nine HMSN/ACC-causing KCC3 mutations have been reported, which include six randomly distributed frameshift mutations, two carboxy-terminal-truncating nonsense mutations and a missense mutation (2, 4, 5); thus, the most frequent alterations in HMSN/ACC are the total or partial elimination of KCC3 carboxy-terminal regions. Data collected from heterologous expression studies in *Xenopus* oocytes using truncated KCC3 mutants revealed that the loss of the last 140 AA is sufficient to abolish the KCC3-driven flux of $^{86}\text{Rb}^+$ (2, 4). We have recently demonstrated that this loss of function includes the failure of the transporter to interact with brain-type creatine kinase (CK-B) (6). However,

the R207C missense mutation is predicted to result in a full-length protein bearing an amino acid exchange that should not impact the interaction of KCC3 with CK-B, which suggests that other mechanisms may be involved in KCC3 dysfunction in HMSN/ACC (5).

In the present study, we report a novel and very distal *KCC3* truncation mutation in an HMSN/ACC family. We found that the targeting of this and other mutant KCC3 proteins to the plasma membrane are perturbed. These results provide evidence that a trafficking defect may in part explain the KCC3 dysfunction found in HMSN/ACC.

RESULTS

R1034X is a novel and most distal KCC3 truncating mutation

Sequencing of the *SLC12A6/KCC3* gene in two HMSN/ACC cases from an Algerian consanguineous family revealed a homozygous cytosine-to-thymine transition (3402C→T) in exon 25 (Fig. 1a). The mutation creates a premature stop codon that leads to the loss of the last 17 amino acids of KCC3, which corresponds to only ~2% of the total protein sequence (R1134X mutant); thus, R1134X represents the least truncated KCC3 mutant. In comparison, the exon 22 mutation, which was the smallest previously identified KCC3 truncation, causes the elimination of the last 140 amino acids of the protein, which correspond to ~12% of the whole protein. In all, nine of the eleven HMSN/ACC mutations result in a net loss of the amino acids within the CTD of KCC3.

Truncated R1134X fails to interact with CK-B

The brain-type creatine (CK-B), which is an ATP-generating protein, is a potent activator of KCC3 via a direct interaction with the co-transporter's carboxy-terminal domain (CTD) (6). We have previously used a yeast-two hybrid system to demonstrate that the sequence encompassing the last 18 amino acids of KCC3 is necessary for its interaction with human CK-B (6), which suggests that the physical interaction between CK-B and R1134X (which lacks the last 17 amino acids) may be impaired *in vivo* (Fig. 1B). To confirm this hypothesis, we performed dual immunofluorescence studies with CK-B- and KCC3-specific antibodies using human HeLa cells that were transfected with R1134X construct and which express CK-B endogenously. Although we observed the interaction between wild-type KCC3 and CK-B as previously reported, we failed to observe a co-localization between CK-B and R1134X (Fig. 2a).

To confirm that the disruption of R1134X and CK-B interaction has an impact on the co-transport activity, wild-type KCC3 (WT) and the nonsense mutant R1134X were

expressed in *Xenopus* oocytes and $^{86}\text{Rb}^+$ uptake upon swelling-activation of KCC3 was measured. As expected, the wild-type transporter induced a significant flux ($P = 0.027$ ANOVA compared with the control), which was abolished in the absence of chloride or by treatment with 200 μM of DNFB, a brain-type creatine kinase (CK-B) inhibitor. In contrast, R1134X did not induce a significant flux in *Xenopus* oocytes (Fig. 2d). This further associates the loss of interaction with CK-B with the loss of function of truncated KCC3.

It is noteworthy that the last 17 amino acids missing in R1134X contain two highly conserved sequences probably involved in the protein trafficking: a hydrophobic tetrad that participates in the transit of other proteins of the SLC12 family and a C-terminal tyrosine sorting motif maybe controlling the co-transporter trafficking (Fig. 1b). When we performed immunoblots of plasma membrane fractions from *Xenopus* oocytes expressing R1134X, we observed only small amounts of the mutant protein in the purified extract (Fig. 2e). In addition co-staining of R1134X and CK-B in mammalian cells revealed that the most abundant staining of the truncated protein was intracellular and not at the cell periphery. These data suggest that defect of mutant KCC3 trafficking could be a pathomechanism leading to KCC3 dysfunction even without a truncation.

The R207C mutation does not result in KCC3 truncation

The screening of the *KCC3* gene for mutations in a Turkish patient and his parents revealed the presence of a putative 619C \rightarrow T missense mutation in exon 5 (Fig. 3a). This mutation was previously reported and contrasted with the contention that KCC3 truncation mutations alone can lead to disease (5). Given that the vast majority of known HMSN/ACC mutations truncate the co-transporter, we investigated whether the nucleotide transition in exon 5 might lead to aberrant RNA splicing and result in a "classic" case of HMSN/ACC truncation. To do so, total RNA extracted from lymphoblasts of the patient bearing the 619C \rightarrow T missense mutation was reverse transcribed to the corresponding cDNA. Three primer sets that flank the mutated exon 5 were used in a PCR reaction to assess exon splicing. We observed that all predicted PCR fragments from the patient were present and

were equal in size to those of the control sample, which implies a normal exon splicing of the mutant RNA (Fig. 3b). This overall suggests that a full-length KCC3 mutant protein (R207C) can be produced from this mutated KCC3 mRNA.

The R207C mutation affects KCC3 function through transit defect to the cell surface

So far, KCC3 loss of function was associated with disruption of truncated KCC3 interaction with CK-B. However the missense KCC3 mutant R207C is not truncated but is a full-length protein that still co-localizes with CK-B in mammalian cells (supplementary data: Fig. E1). This suggests that disruption of KCC3 interaction with CK-B is not the mechanism of dysfunction of the R207C mutation. Given that the KCC3 R207C mutant interacts with CK-B and is likely translated into an intact protein, we wondered if it may in fact be a benign variant, and not a causative mutation. To assess its activity, R207C was expressed in *Xenopus* oocytes and $^{86}\text{Rb}^+$ uptake upon swelling-activation of KCC3 was measured. Similarly to the truncated mutants, full-length R207C expression did not result in a significant flux in *Xenopus* oocytes (Fig. 4a), confirming that this mutation impairs KCC3 function and is likely causative in HMSN/ACC. Although R207C co-localized with CK-B in HeLa cells, we observed a strong perinuclear localization of the mutant protein in these cells, suggesting a deficiency in the transit of the R207C protein to the plasma membrane in this system (supplementary data: Fig. S1). KCC3 loss of function could therefore be caused by the absence of the mutant co-transporter at the plasma membrane. To investigate this hypothesis, we first performed Western blot analysis of plasma membrane proteins isolated from *Xenopus* oocytes expressing the wild-type and the mutant transporters. Similarly to R1134X, little R207C protein was observed in purified plasma membrane extracts of *Xenopus* oocytes (Fig. 4b), suggesting defective KCC3 transport to the cell membrane. To further support this hypothesis, we sought to measure how much of the mutant forms of KCC3 reached the plasma membrane in mammalian cells. Wild-type

and mutant KCC3 were expressed in HeLa cells (Fig. 5a) and cell surface localization was quantified by measuring the rate of co-localization between KCC3 and pan-cadherin, which is a plasma-membrane marker, using Pearson's coefficient (Fig. 5b). The wild-type protein was mainly found at the plasma membrane of transfected HeLa cells (Pearson's coefficient = 0.84). In contrast, most of the mutant R207C did not reach the plasma membrane (Pearson's coefficient = 0.285; $P < 0.0001$ when compared with wild-type-transfected cells). For the R1134X mutation, plasma membrane localization was also impaired (Pearson's coefficient = 0.57; $P = 0.003$ when compared with wild-type-transfected cells). Instead, R207C and R1134X accumulated inside the cytosol. This shows that the transit of these mutant cotransporters is deficient.

The R207C amino acid exchange stabilizes the homodimeric structure of KCC3

The R207C missense mutation results in the replacement of a highly conserved arginine residue with a cysteine residue, within or close to the first transmembrane domains of R207C (Fig. 3c). Moreover, cysteines are prone to form intramolecular and intermolecular disulfide bonds in proteins to promote the formation of tertiary and quaternary structures; thus the introduction of novel cysteines can create abnormal structures. It was also reported that cation-chloride cotransporters form transient homodimers and heterodimeric structures in *Xenopus* oocytes (7). As enhanced dimerization can alter the membrane targeting process through organelle retention (8), we investigated whether this mechanism was at the origin of the deficient transit of R207C to the plasma membrane.

Wild-type and mutant KCC3 proteins were transiently expressed in mammalian cells and total protein lysates prepared for immunodetection by Western blots. The immunoblots for wild-type KCC3 revealed an abundant band at ~150 kDa (KCC3 expected size) but also a faint band at ~300 kDa, which corresponds to double the size expected for KCC3 monomers. In the R207C protein extract, immunoblots revealed an abundant band at

~300 kDa (Fig 5c). Increased stringency or additional sonication was required to disrupt some of these structures and restore a migration profile closer to the wild-type protein (Fig 5d-e). This suggests that the arginine to cysteine exchange in R207C favors the stabilization of homodimeric structures, possibly through the formation of a novel intermolecular disulfide bond. This dimerization may affect the transit of R207C to the plasma membrane, which results in the intracellular accumulation of the mutant protein.

Curcumin treatment partially rescues the transit defect of mutant KCC3

To determine the predominant site of mutant protein accumulation, we used a panel of organelle markers, which included markers for the golgi, proteasome, clathrin-coated vesicles (data not shown), lamellipodia (*e.g.* cortactin), ER (*e.g.*, calreticulin) and plasma membrane (*e.g.*, pan-cadherin) in co-immunofluorescence labeling experiments. No specific localization of R1134X was detected, although co-localization was detected with cortactin (Fig 6a). However, we observed a strong co-localization signal between R207C and the ER markers (Fig 6b). Aberrant distribution of the mutant proteins was also observed in PC-12 cells that were induced to differentiate by NGF treatment (Fig. 6c). This overall suggests that R207C dimers may be retained in the ER and thus be kept from reaching the plasma membrane.

Chemical compounds have been shown to favor the release of mutant transmembrane proteins that are aberrantly retained in the ER. Curcumin is one of the most promising compounds that help to relieve this retention, as it is harmless, eatable, and works in mouse models (9, 10). We sought to determine whether R207C retention in cultured cells could be lessened by curcumin treatment by incubating cells expressing the mutant protein with 5–40 μ M of curcumin at 37°C. The localization of the protein at the plasma membrane was evaluated using pan-cadherin as a specific plasma-membrane marker in immunofluorescence studies. A concentration of curcumin of 10 μ M was sufficient to rescue some of the transit to the plasma membrane (data not shown); however,

the best results were observed with 20 μ M curcumin (Fig 6 d-e). This result further supports the hypothesis that R207C dimers are retained within the ER.

Aberrant mutant KCC3 localization in HMSN/ACC brain

HMSN/ACC is most frequent in the French-Canadian population and is mainly caused by the T813X truncation mutation. We have previously shown that the T813X mutation leads to the loss of function of the cotransporter using a *Xenopus* oocyte flux assay. Although T813X was detected at the oocyte membrane (2) it has been reported that mutant channels or transporters can behave differently in the *Xenopus* oocyte system, where mutant proteins are less prone to traffic defects compared with mammalian cells and *in vivo* scenarios (8). In addition, when we expressed mutants protein R1011X, L808X (4) or R1134X in mammalian cells, we observed aberrant intracellular accumulation of the mutant proteins. Finally, all truncated transporters, including the French-Canadian mutant protein T813X, lack a C-terminal hydrophobic tetrapeptide involved in the trafficking of other SLC12 cotransporters. All these data suggest that T813X and the other mutant transporters might have some traffic defects *in vivo*.

To test this hypothesis, we focused on KCC3 localization in brain. First, both the wild-type KCC3 and the mutant T813X could be detected by Western-blot using protein extracted from brain tissue of a control individual and a French Canadian HMSN/ACC patient (Fig. 7a). Then, to evaluate if defective transit participates in T813X pathogenesis, we observed the distribution of T813X truncated protein in brain histological sections by immunofluorescent labeling of KCC3. Using confocal microscopy, we found particularly abundant staining of T813X around the nucleus whereas KCC3 distribution in unaffected neurons was more peripheral (Fig. 7b). In addition, swollen axons of the HMSN/ACC patient lacked KCC3 staining (data not shown). This suggests that a transit defect of T813X may occur in HMSN/ACC brains as well.

DISCUSSION

Herein, we confirmed that the loss of KCC3 activity is systematic in HMSN/ACC but that different pathogenic mechanisms can lead to the inactivation of a cotransporter. To participate in the electroneutral transport of ions, KCC3 needs to be translated and targeted to the plasma membrane, where it has to be properly activated. Some mutations have been associated with abrogated or defective protein biosynthesis. Because of their altered structure, the mutant mRNAs tend to be unstable and are efficiently cleared from the cell. As a result, virtually no protein is expressed. However, we did not observe anomalies in mutant KCC3 biosynthesis in this study (supplementary Fig. S2). Many variants, including those expressed in heterologous systems, fail to be properly processed to a mature glycosylated form and/or to be transported to the plasma membrane. In Gitelman's disease, the majority of the missense mutations affect the glycosylation of NCC, however non-glycosylated forms can still be processed to the cell surface. Alternatively, an apparently normal processing of a mutant protein with normal functional and kinetic properties can be associated with an impaired insertion into the plasma membrane. The most common mutation in cystic fibrosis (*i.e.*, deltaF508) belongs in this category and, if correctly processed to the membrane, possesses residual activity and leads to a sustained normal or only mildly affected phenotype. For this reason, mutations in this group are promising targets for therapies aimed at correcting the processing and delivery of the mutant protein to the membrane. Mutations in channels/cotransporters, which produce abnormal protein variants, can also affect the regulation of the function of the protein eventually by preventing physical binding to partners that are required for its activation. In type I Bartter's disease, the mutated cotransporters are normally synthesized, glycosylated and inserted into the plasma membrane, which implies a defect in the functional properties or in the intrinsic activity of the protein. Finally, some mutations accelerate the removal from the plasma membrane and/or degradation of the mutant protein. Truncation of the CTD of

CFTR reportedly leads to a marked instability of an otherwise fully processed and functional variant.

Our biochemical and cellular data demonstrate the presence of at least two distinct mechanisms that lead to KCC3 dysfunction in HMSN/ACC. We confirmed that the functional interaction between CK-B and truncated KCC3 is systematically disrupted. We also provide evidence that indicates that defective transit to the plasma membrane is involved in the loss of function of mutant KCC3 in HMSN/ACC. In addition, we showed that enhanced dimerization of cation-chloride cotransporters seems to disturb their transit and activity. Interestingly, several similar arginine/glycine to cysteine substitutions in NCC (R399C, G496C, R642C, R852C, and R919C) have been reported as being causative in Gitelman's disease (3).

Cation-chloride cotransporters show self-interacting properties when expressed in *Xenopus* oocytes (7). Here, we provide evidence that the R207C mutation induced the stabilization of dimeric structures, which demonstrates the occurrence of KCC3 dimerization in mammalian cells. To allow the formation of intermolecular disulfide bonds, the cysteine residues involved need to be physically close in the quaternary structure, which suggests that the first transmembrane domains directly allow the association between the KCC3 subunits. However, the failure of the aberrant dimers to reach the plasma membrane suggests that, in normal physiological conditions, the dimerization is a regulated process that is not constitutive but occurs transiently. A similar mechanism leads to the mislocalization of the G480C form of CFTR in cystic fibrosis. In this case, the substitution of glycine with cysteine results in a protein that is not fully glycosylated and fails to reach the plasma membrane in mammalian cells. However, the mutant CFTR protein retained normal chloride channel activity in *Xenopus* oocytes, as channels and transporters are less likely to experience intracellular processing and trafficking disturbance in this system (8). Unfortunately, we were not able to detect a significant activity of R207C in *Xenopus* oocytes, maybe because the number of mutant proteins that reached the oocyte plasma membrane was not sufficient to allow the detection of co-transport activity.

The R1134X protein was underrepresented on Western blot from mammalian cells when compared with the wild-type protein (Fig. 2c, 5c-e and S1). This underrepresentation of R1134X on Western blot may indicate a failure of cultured cells transfected with the mutant construct to proliferate at the rate of the cells expressing the wild-type construct. This hypothesis could be supported by the fact that KCC3 has been implicated in cell proliferation in normal and pathological instances (11). However, no obvious differences in cell density were observed in the nervous system of this HMSN/ACC patient when compared with the control sample (unpublished data). It is worth noting that the mutant cotransporter T813X also seemed to be under-expressed in the brain of a HMSN/ACC patient (Fig. 7a). Therefore, these observations may indicate an increased instability of the truncated proteins, which could either be due to the aberrant structure of the mutants and recognition by the cellular misfolding/degradation pathway or to their accelerated recycling from the plasma membrane to the cytoplasmic degradation machinery.

HMSN/ACC is a severe and progressive neurodegenerative disease that exhibits an early onset of symptoms. Signs of HMSN/ACC, such as hypotonia and delays in motor development skills, are noticed before one year of age. However, the motor abilities of patients progress slowly to 4–6 years of age and these children are able to stand and walk with some help. This is followed by a motor deterioration that generally renders affected subjects wheelchair-dependent by adolescence. The patients generally die at the average age of 33. Interestingly, the mutant protein that exhibits a truncation of the last 17 amino acids is associated with one of the worst clinical manifestations of HMSN/ACC, whereas the patient bearing the missense mutation presents with one of the milder phenotype reported to date (5) (Table 1). Further investigations will be required to allow the clear establishment of genotype–phenotype correlations, as nonfunctional truncated transporters worsen the HMSN/ACC phenotype whereas potentially functional but aberrant KCC3 dimers may attenuate some aspects of the disease presentation.

The distinct pathomechanisms uncovered here suggest novel therapeutic approaches for the management of the disorder or for the modulation of the progression of the disease. The structural similarities between KCC3 and CFTR suggest that efficient therapies identified for cystic fibrosis may be applicable to HMSN/ACC, at least at the molecular and cellular levels. For example, incubation with curcumin restores the transit of CFTR units that are functional but are trapped in the ER by altering the function of resident ER chaperones as well as other mechanisms (13-15). This treatment yielded promising results in mouse models of cystic fibrosis (9). Accordingly, we found that curcumin relieved the ER retention of dimerized R207C in mammalian cultured cells. A diet enriched in curcumin may therefore be beneficial for the relief or delay of some of the HMSN/ACC symptoms in patients bearing the R207C mutation, including the Turkish patient described in the present study (as he has not yet reached puberty).

MATERIALS AND METHODS

Mutation screening

Blood samples were collected with informed consent from Algerian Turkish families (Fig. 1). DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using standard methods. A clinical HMSN/ACC diagnosis was established by a neurologist according to the basic features of the disease (Table 1). The 26 exons of the *KCC3* gene were amplified by PCR using intronic primers (4) and products were directly sequenced on an ABI 3700 sequencer, according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA).

RT-PCR

Total RNA was extracted from immortalized lymphoblasts of a Turkish patient bearing the exon 5 missense mutation (619C→T; R207C) using the RNeasy kit (QIAGEN), according to the manufacturer's protocol. The extracted RNA was reverse transcribed (RT) using a classic protocol (16). Different primers were design to flank the mutation: primers "4" hybridized at the beginning of exon 4 (5'-GAAATGGACACCAGACCGAA-3'), primers "4/5" hybridized at the junction of exons 4 and 5 (5'-GCCACCAAGACCCCCCAA-3'), primers "5/6" hybridized at the junction of exons 5 and 6 (5'-TCAACATTGTACAGCAGCAG-3'), and primers "6" hybridized at the end of exon 6 (5'-TGGCACCCTCCATTAGTGG-3'). The primers flanking exon 5 of the *KCC3* gene were used in PCR reactions following a classic protocol (2) and products were loaded on agarose gel for observation. A DNA construct containing the wild-type *KCC3* cDNA was used as a positive control in the PCR reaction.

Plasmid constructs and mutagenesis

The wild-type KCC3 cDNA (in the pGEM vector), which was kindly provided by Dr Mount (Harvard Medical School, Boston, MA, 02114, USA), was subcloned in pcDNA3 vector (Invitrogen) to allow expression in mammalian cells. To generate the R207C and R1134X mutant transporters, the 619C→T transition mutation in exon 5 and the 3402C→T transition mutation in exon 25 of *KCC3* were introduced in the pGEM and pcDNA constructs using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) with the lower primers: 5'-TTCTTCAGGTTTTTGCAATT-3' and 5'-GAAGTGATCACTATTTATTC-3'. DNA sequence accuracy was verified by sequencing.

***Xenopus laevis* flux assay**

The activity of the cotransporter was determined by assessing $^{86}\text{Rb}^+$ uptake, according to a previously described protocol (6). Briefly, the pGEM templates were digested with *NotI* (for linearization) and the cRNAs were transcribed *in vitro* using T7 RNA polymerase. Groups of 20 or more *Xenopus* oocytes were injected with 46 nL of water with or without wild-type or mutant cRNA. The uptake experiment consisted of a 60 min incubation period in a hypotonic medium (in mM: 52 Na-cyclamate, 3.3 KCl, 0.74 CaCl₂, 0.82 MgCl₂, 10 HEPES/Tris, pH 7.4, with 10 μM ouabain), followed by a 60 min incubation in an uptake medium (mM: 49 NaCl, 15 Na-cyclamate, 0.74 CaCl₂, 0.82 MgCl₂, 30 RbCl, 10 HEPES/Tris, pH 7.4, and 10 μM ouabain supplemented with 50 Ci of $^{86}\text{Rb-Cl}$). The KCC3-dependent uptake of $^{86}\text{Rb}^+$ was deduced by exposing groups of cRNA-injected oocytes to 1 mM of the loop diuretic agent furosemide. Dependency of the function of KCC3 on CK-B activity was determined by exposure to 200 μM 2,4-di-nitro fluoro benzene (DNFB). The uptake experiment was stopped after 60 min by five washes in ice-cold uptake solution without the isotope, to remove extracellular fluid tracer. The oocytes were lysed in 10% sodium dodecyl sulfate and tracer activity was measured for 2 min in a liquid scintillation counter.

Cell culture and transfection

HeLa cells (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (50 units/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin) at 37°C with 5% CO₂ (all supplied by Gibco). PC12 cells were grown on poly-D-lysine-coated coverslips placed in DMEM/F12 containing 10% heat-inactivated horse serum (iHs), 5% FBS, and antibiotics (50 units/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin) at 37°C with 5% CO₂.

The plasmids used in the transfection studies were prepared using the Qiagen Plasmid Maxi Kit, according to the manufacturer's instructions. Transient transfections were performed on cells using the Lipofectamine transfection reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Cells were incubated for 24 h before replacing the medium, and transgene expression was assayed at least 36 h post-transfection. Typically, a transfection efficiency of the transgene of 20–50% was achieved; equivalent transfection efficiency among the various transfection experiments was confirmed by Western blot.

PC12 differentiation was induced by treating the cells with 50 ng/ml nerve growth factor (NGF) in a reduced serum environment (2,5% iHs) for 3 days.

Curcumin treatment was performed prior to the immunofluorescence experiment. The cells were incubated for 3 hours in curcumin at a final concentration 5 to 40µM. The cells were rinsed several times in PBS to get rid of the curcumin before the immunostaining experiment.

Immunofluorescence study

Cells grown on coverslips were induced to differentiate if necessary (in the case of PC12 cells) and were then transiently transfected with the pcDNA 3.0 wild-type or mutant KCC3 constructs, fixed in 4% paraformaldehyde solution in PBS at room temperature for 10 min, and finally processed for immunofluorescence staining. For this, cells were permeabilized in very mild conditions (0,01% Triton X-100 for 3 min) and nonspecific site blocking was performed in 10% normal goat serum (NGS) solution in PBS for 1 h at room

temperature, which was directly followed by incubation with anti-KCC3 (1:500; Abnova), anti-CK-B (1:100; OEM concept), anti-pan cadherin (1:500; abcam), or anti-calreticulin (1/250; Abcam) primary antibodies in 5% NGS/PBS overnight at 4°C. Coverslips were then washed twice in PBS, incubated with the appropriate secondary antibodies (Jackson Labs), and mounted on slides for confocal microscopy (Leica).

Paraffin-embedded fragments of brains from an HMSN/ACC patient were sectioned (5 µm) and placed on glass slides. The sections were processed for immunohistochemistry using the following protocol: after deparaffinization and rehydration, the slide-mounted tissue sections were incubated in an antigen retrieval solution (DAKO S1699) preheated to 85°C for 1 h. Sections were cooled to room temperature and were then rinsed three times with PBS. After a 30 min permeabilization step in 0.2% Triton X-100/PBS, the sections were blocked in a 10% solution of NGS in 0.02% Triton X-100/PBS at room temperature for 1 h. Incubation of primary antibodies at suggested concentrations (diluted in 2% NGS in 0.02% Triton X-100/PBS) was then carried out overnight at room temperature. Sections were washed three times in PBS the following day. Secondary antibody incubation was carried out using the appropriate Alexa antibodies (1:1000 in 2% NGS/0.02% Triton X-100/PBS) for 1 h at room temperature. Sections were again washed three times in PBS. The slides were then coverslip-mounted using Mowiol (Fluka, Polyvinyl alcohol 4-88) and were visualized using appropriate filters on a Leica DM6000 microscope.

Immunoblot

HeLa cells were plated onto 10 cm petri dishes, grown to confluence, and then transfected with pcDNA-KCC3 wild-type or mutant constructs, as described previously (Salin-cantegrel et al., 2008). After transfection, cells were placed in fresh DMEM/10% FBS for 48 h. Whole-cell lysates were harvested by washing cells in cold PBS and by scraping them into RIPA or SUB lysis buffer supplemented with Complete protease inhibitors (Roche). The extracted proteins were separated by 8% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with antisera to KCC3 (1:1000) or CK-B

(1:100). The blots were stripped and reprobed with an anti-actin antibody (Chemicon) to verify equivalent loading of protein.

Statistical analyses

Protein colocalization rates were evaluated using Pearson's coefficient on confocal microscopy, using the LAS AF software (Leica). Significance was set at a two-tailed Student's *t* test *P* value < 0.01. Results were presented as means ± the standard error (SE). The significance of the differences between oocyte groups in the flux assays was tested by one-way analysis of variance (*ANOVA*).

FOOTNOTES

We want to thank the families for participating in this research. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research and a grant by the Fondation des Jumelles Coudé. The authors have reported no conflicts of interest.

The abbreviations used are: ANOVA: analysis of variance; CCC: cation chloride cotransporter; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; CK-B: creatine kinase brain-specific; CNS: central nervous system; CTD: carboxy-terminal domain; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium; DNFB: di-nitro-fluoro-benzene; ER: endoplasmic reticulum; FBS: fetal bovine serum; HMSN/ACC: hereditary motor and sensory neuropathy; iHs: heat-inactivated horse serum; NCC: sodium-chloride cotransporter; NKCC2: sodium-potassium-chloride cotransporter 2; KCC3: potassium-chloride cotransporter 3; RT: reverse transcription; Pan-cadh: pan-cadherin; PCR: polymerase chain reaction; PM: plasma membrane; SD: standard deviation; SE: standard error.

TABLES**Table 1. Clinical features**

Observations	Case 1 (5)	Case 2	Case 3
Mutation	R207C	R1134X	R1134X
Reflexes	Present tendon reflex	Absent	Absent
Tonicity	Normal tonus in upper extremities	Absent	Absent
Motor milestones	Walk with support at 5 y/o	Never achieved walking	Never achieved walking
Mental retardation	Mild	Moderate	Moderate
Seizures	None	Partial and Generalized	Generalized
ACC	Complete (MRI)	Complete (MRI)	Complete (MRI)

ACC: agenesis of the corpus callosum; MRI: Magnetic Resonance Imaging; y/o: years old

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Identification of a novel HMSN/ACC truncating mutation.

Identification of a novel HMSN/ACC truncating mutation. (a) Mutated sequence of one of the affected individuals bearing the *SLC12A6/KCC3* homozygous 3402C→T transition, with exchange of Arg¹¹³⁴ for a stop codon (R1134X). (b) Representation of the protein sequence encompassing the R1134X mutation and amino acid conservation in various SLC12 family members. The hydrophobic tetrad suggested to be involved in cation-chloride cotransporters trafficking and an amino-terminal tyrosine residue predicted *in silico* to be involved in membrane protein sorting are shown.

Figure 2. R1134X is non-functional and fails to interact with CK-B.

(a) Assessment of the interaction between CK-B and wild-type KCC3 (*top*) or R1134X (*bottom*). The loss of interaction between the R1134X and CK-B was inferred (using confocal microscopy) from the absence of co-localization of these proteins in HeLa cells transiently transfected with wild-type and mutant KCC3. KCC3 immunostaining is shown in red, CK-B immunostaining is shown in green and co-localization is indicated by a yellow signal in the overlay image. (b) The inhibition of CK-B by incubation with DNFB for 4 hours had no dramatic effect on the transit of wild-type KCC3 (*top*) to the plasma membrane nor on the subcellular localization of R207C (*middle*) and R1134X (*bottom*). (c) Western blot analysis of wild-type, of R1134X and of endogenous CK-B in HeLa cells. (d) Assessment of wild-type and mutant KCC3 co-transport activity. Measurements of ⁸⁶Rb⁺ uptake invoked under hypotonic conditions in a representative experiment in *Xenopus* oocytes injected with the wild-type and mutant KCC3 constructs. The indicated SDs were calculated for experimental groups of 20 or more oocytes. Wild-type KCC3 activation mediated a significant ⁸⁶Rb⁺ transport, which was fully abolished without Cl⁻ and by 250 μM DNFB, which is a specific inhibitor of CK-B. Significance was set at $P < 0.05$ (one-way ANOVA). (e) Immunoblot analysis of wild-type and mutant KCC3 at the plasma

membrane of *Xenopus* oocytes. Total protein and plasma membranes of *Xenopus* oocytes expressing wild-type and mutant KCC3 were purified using a protocol previously described (17). The protein extracts were loaded on a denaturing gel and probed with a KCC3 N-terminal-specific antibody.

Figure 3. R207C is not a truncated protein.

(a) Sequencing results for exon 5 of *SLC12A6/KCC3* in a Turkish patient bearing the 619C→T transition; the mutation is expected to exchange Arg²⁰⁷ for Cys²⁰⁷ (R207C). (b) Total RNA extracted from lymphoblasts of the patient bearing the R207C mutation was analyzed by RT-PCR to assess the structure of the mutant RNA. PCR primers encompassing the junction of exons 4 and 5 (referred to as “4/5”) and exons 5 and 6 (referred to as “5/6”) and at the beginning of exon 4 (referred to as “4”) and at the end of exon 6 (referred to as “6”) were used to assess the structure of KCC3 RNA. The control corresponds to the wild-type cDNA. (c) Representation of the protein sequence encompassing the R207C mutation and amino acid conservation in various species. Highly conserved residues are indicated by a star.

Figure 4. R207C and R1134X are non-functional proteins.

(a) Assessment of wild-type and mutant KCC3 co-transport activity. Measurements of ⁸⁶Rb⁺ uptake invoked under hypotonic conditions in a representative experiment in *Xenopus* oocytes injected with the wild-type and mutant KCC3 constructs. The indicated SDs were calculated for experimental groups of 20 or more oocytes. Wild-type KCC3 activation mediated a significant ⁸⁶Rb⁺ transport, which was fully abolished by 1 mM furosemide and by 250 μM DNFB, which is a specific inhibitor of CK-B. Significance was set at *P* < 0.05 (one-way ANOVA). (b) Immunoblot analysis of wild-type and mutant KCC3 at the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. Total protein and plasma membranes of *Xenopus* oocytes expressing wild-type and mutant KCC3 were purified using a protocol

previously described (17). The protein extracts were loaded on a denaturing gel and probed with a KCC3 N-terminal-specific antibody.

Figure 5. R207C and R1134X processing to the plasma membrane is impaired.

(a) Assessment of the membrane localization of wild-type KCC3, mutant R207C, and R1134X by confocal microscopy. The use of an anti-pan-cadherin antibody as a specific plasma membrane marker revealed the impaired targeting of R207C to the plasma membrane. KCC3 immunostaining is shown in red and pan-cadherin immunostaining is shown in green. Co-localization is indicated by a yellow signal in the overlay image. (b) Quantification of the co-localization rate between KCC3 and pan-cadherin in cultured cells using Pearson's coefficient. (c-e) Western blot of proteins extracted from cultured cells expressing wild-type, R207C, or R1134X KCC3 proteins. Proteins were extracted using the less stringent PBS-triton buffer (c) or using the more stringent SUB lysis buffer (d) or with additional sonication (e). KCC3 proteins were detected using a specific amino-terminal antibody that recognizes full-length and truncated KCC3. The control corresponded to mock-transfected cells (first lane). The size of the strong band corresponding to the R207C protein extract (third lane) was double that of the wild-type monomers, when extracted in less stringent buffer. Additional sonication successfully dissociated the dimers. The use of SUB revealed the presence of glycosylated and unglycosylated forms of wild-type KCC3, whereas mutant proteins were poorly glycosylated.

Figure 6. Mislocalization of mutant KCC3 in HeLa and differentiated PC12 cells.

(a-b) Assessment of the subcellular colocalization of wild-type KCC3 (*top*), R207C (*middle*), or R1134X (*bottom*) with specific marker in HeLa cells. KCC3 immunostaining is shown in red and cortactin (a) and calreticulin (b) immunostainings are shown in green. Co-localization of red and green staining is evidenced by the generation of yellow signal in overlay images. The R207C mutant protein strongly co-localized with the ER resident chaperon protein calreticulin. (c) Assessment of the localization of wild-type KCC3 (*top*) or

mutant R207C (*middle*) and R1134X (*bottom*) proteins in PC12 cells differentiated using 50 ng/ml of NGF. Similarly to what was observed in other mammalian cell types, R207C exhibited an aberrant distribution in differentiated PC12 cells. (d-e) Curcumin relieved R207C perinuclear retention. (d) Assessment of wild-type KCC3 (*top*), R207C (*middle*), or R1134X (*bottom*) at the plasma membrane in HeLa cells. The R207C mutant protein strongly co-localized with the plasma membrane marker pan-cadherin. (e) Treatment with 20 μ M curcumin restored the localization of R207C at the plasma membrane, to some extent (as assessed by co-localization with pan-cadherin). Similar results were obtained with 40 μ M curcumin. KCC3 immunostaining is shown in red and pan-cadherin immunostaining is shown in green. Co-localization of red and green stainings is evidenced by the generation of yellow signal in overlay images.

Figure 7. Mislocalization of mutant KCC3 in the brain cells of a HMSN/ACC patient.

(a) Proteins extracted from brain regions (cortex and pons) of a HMSN/ACC patient and a control individual were analyzed for the expression of KCC3 using Western blotting. The presence of the truncation mutation in T813X allowed the distinction between the human wild-type KCC3 and the mutant form, as assessed by the shift in the migration profile on Western blot. (b) The cellular localization of wild-type (*lower left panel*) and truncated KCC3 (*lower right panel*) was assessed by immunofluorescence labeling of KCC3 on sections of the pons region from a control unaffected individual and from a HMSN/ACC patient. Mutant KCC3 tended to accumulate perinuclearly *in vivo*. Control stainings without KCC3 primary antibody are shown on the *upper panels*; KCC3 immunostaining is shown in the *lower panels*. The nucleus is in blue, KCC3 staining is shown in white.

Figure S1. R207C and CK-B staining still colocalize in mammalian cells.

Assessment of the interaction between CK-B and wild-type KCC3 (*top*) or R1134X (*bottom*). R207C colocalized with CK-B perinuclearly, but not at the membrane. KCC3

immunostaining is shown in red, CK-B immunostaining is shown in green and colocalization is indicated by a yellow signal in the overlay image.

Figure S2. Mutant mRNA biosynthesis is not affected.

(a) Semi-quantitative RT-PCR from HeLa cells transfected with wild-type and mutant KCC3. Total RNA was extracted from HeLa cells transfected with wild-type and mutant KCC3 constructs. A primer pair flanking KCC3 first exon was then used in a semi-quantitative RT-PCR (shown here is the result obtained after 25 PCR cycles) to allow the detection of the wild-type and the mutant KCC3 mRNA. (b) Western blot of proteins extracted from cultured cells expressing wild-type, R207C, R675X, R1011X or R1134X KCC3 proteins.

Figure 1

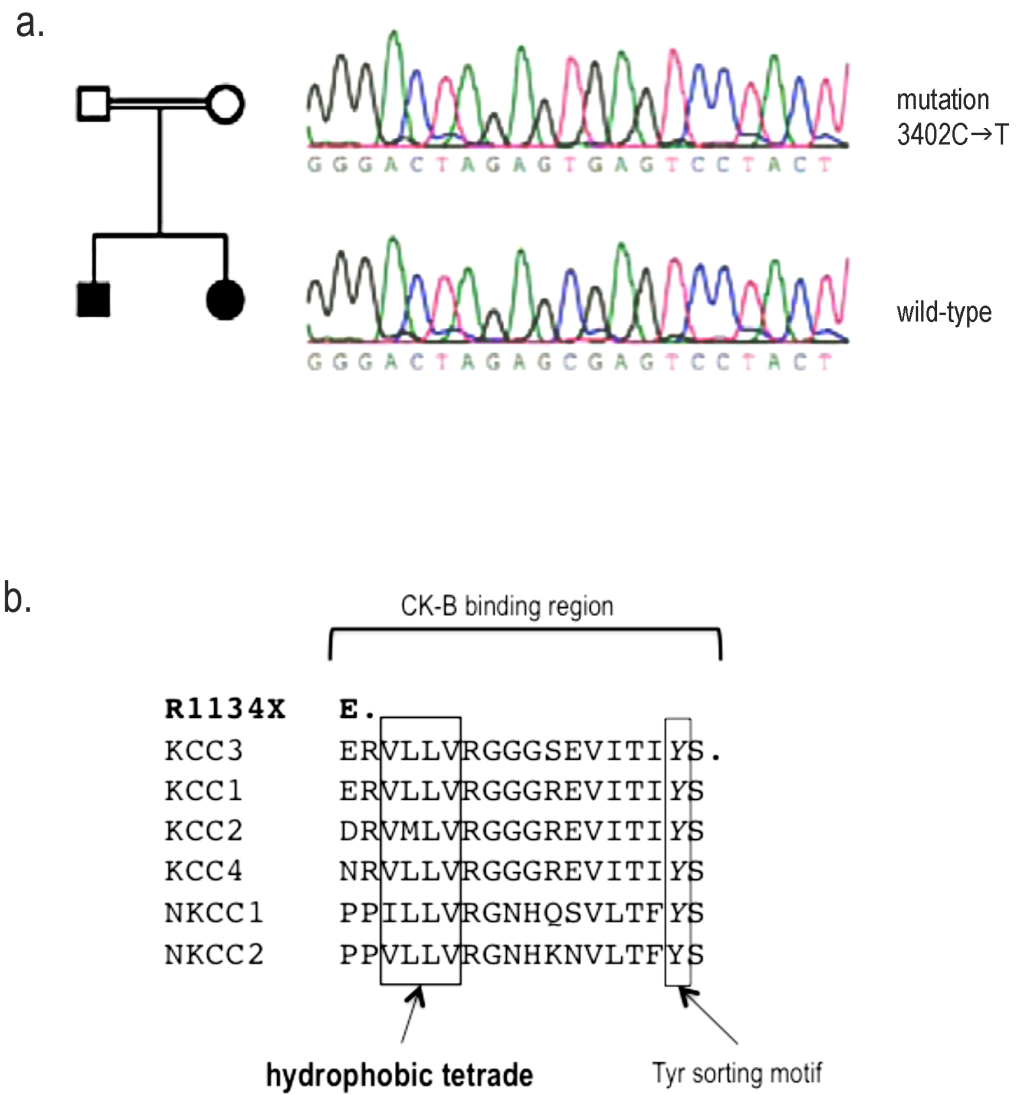


Figure 2

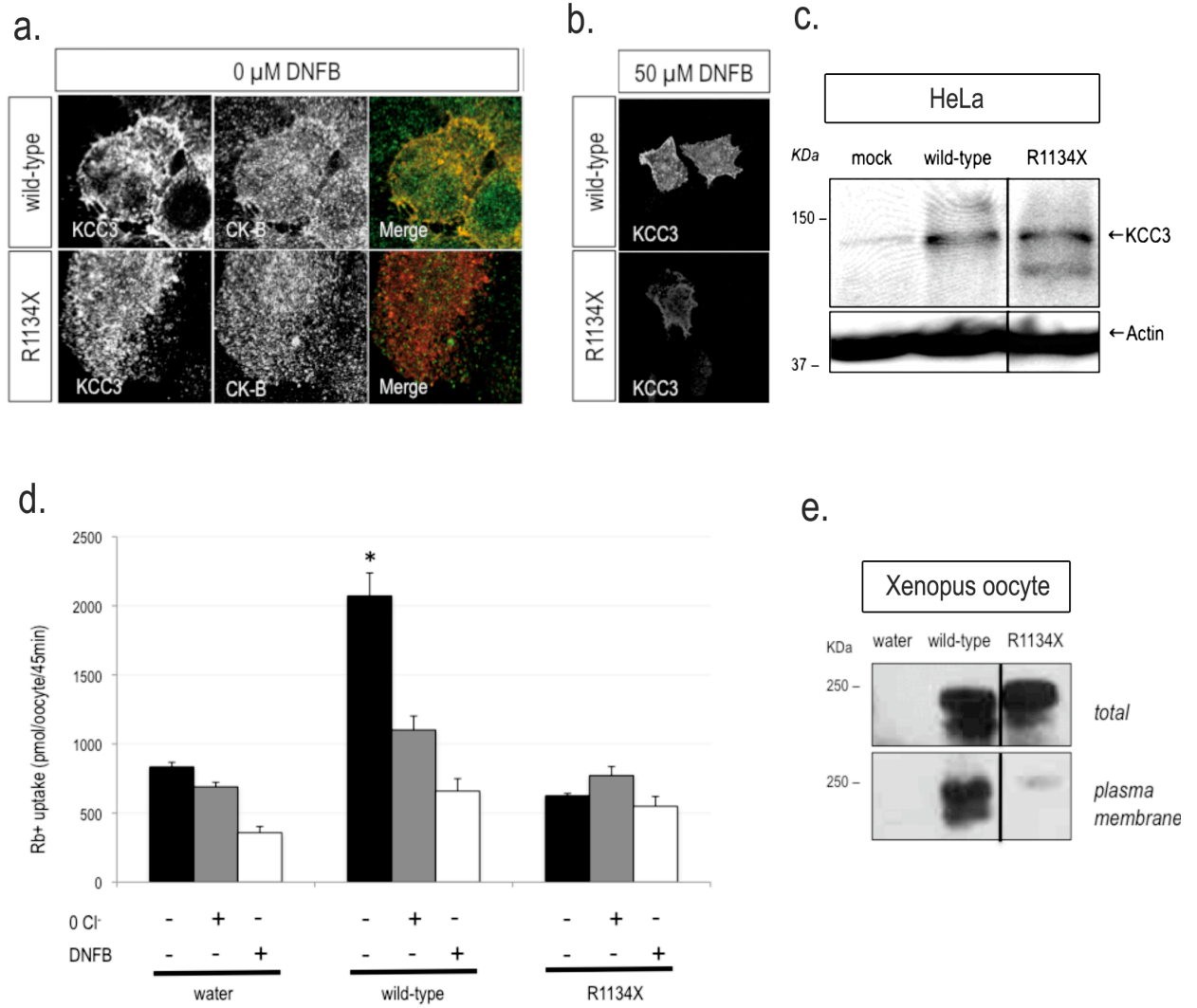
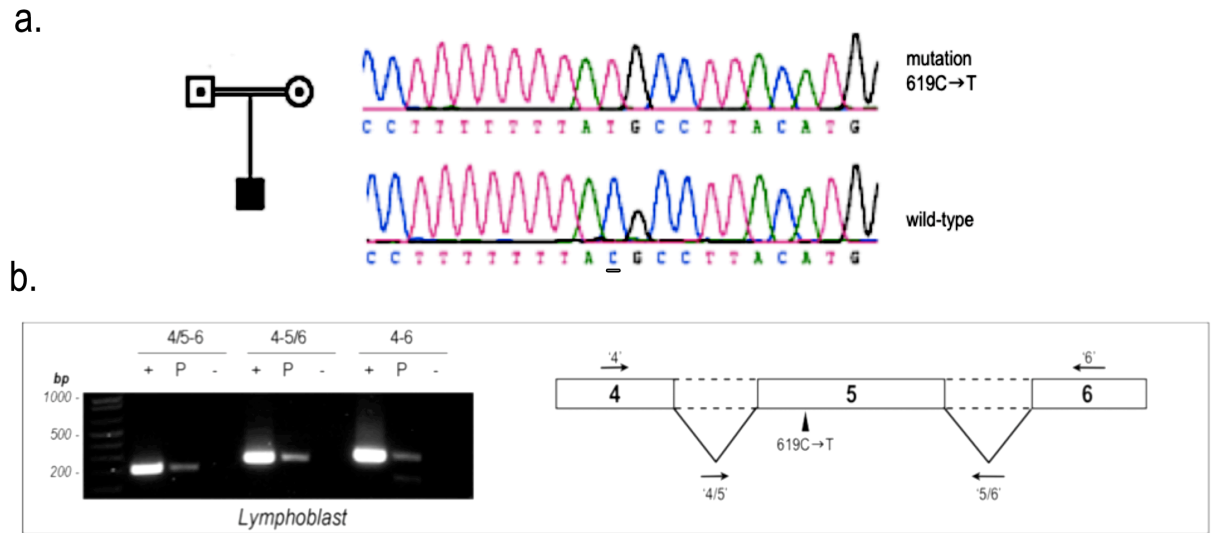


Figure 3



C.

R207C*Homo sapiens**Mus musculus**Xenopus tropicalis**Caenorhabditis elegans***Conservation****LFLCLTWVVG**

LFLRLTWVVG

LFLRLTWVVG

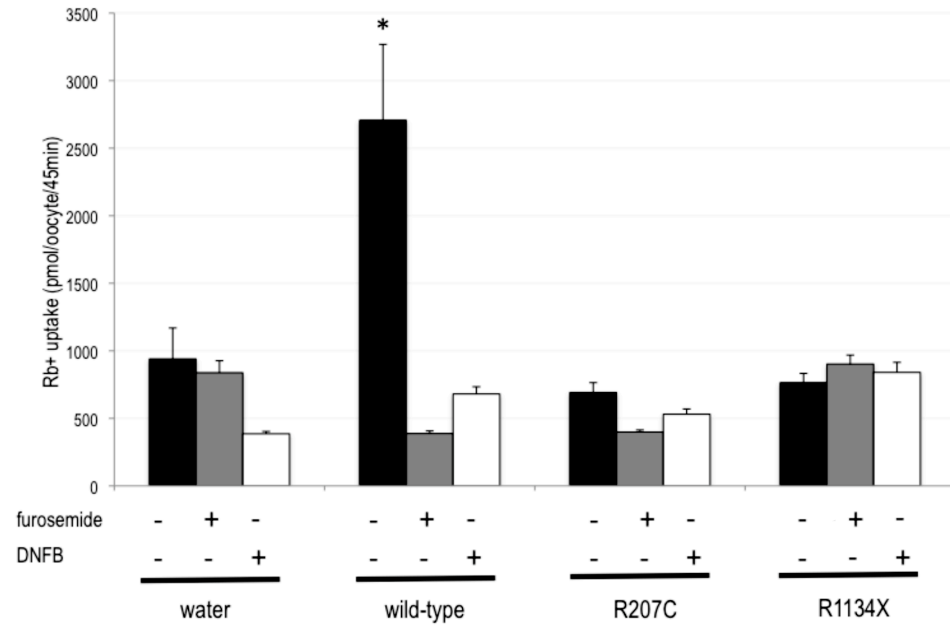
LFLRLTWVVG

L-LRL---YGT

* *** **

Figure 4

a.



b.

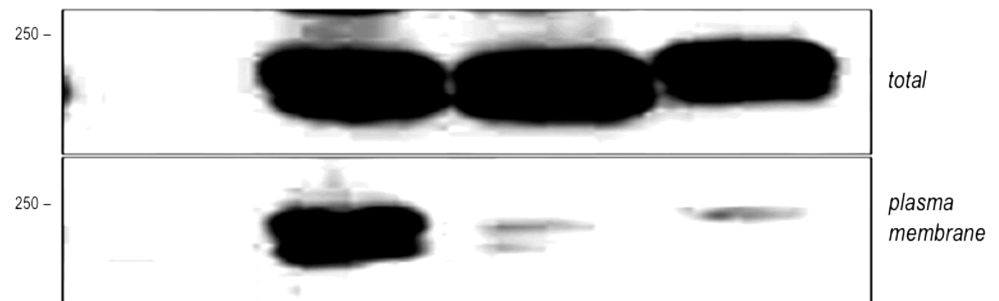


Figure 5

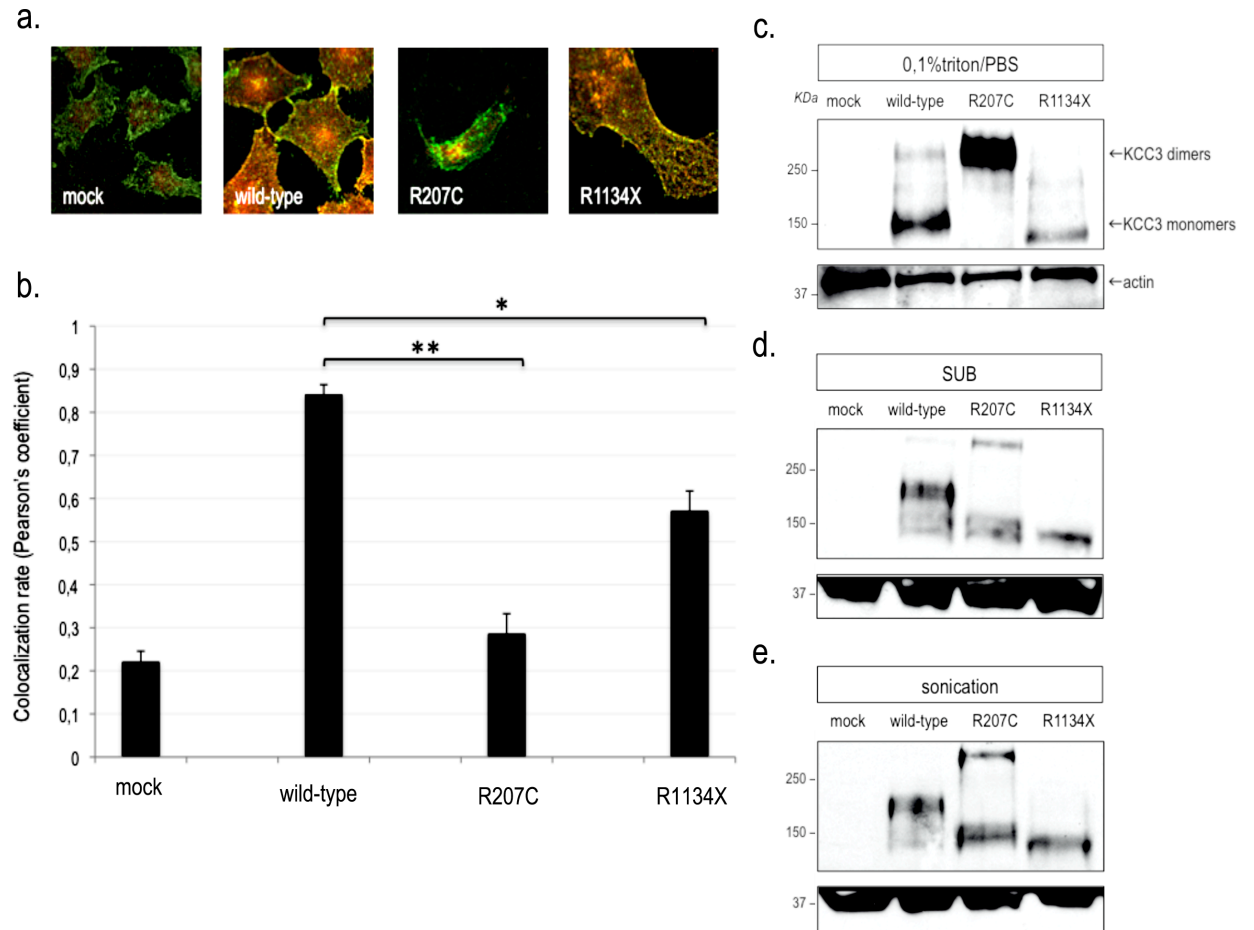
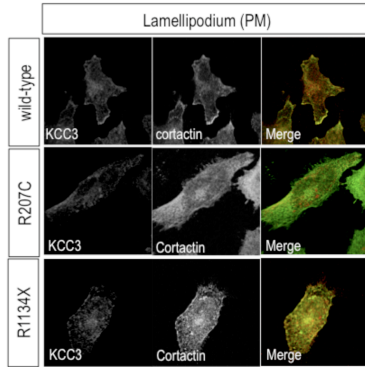
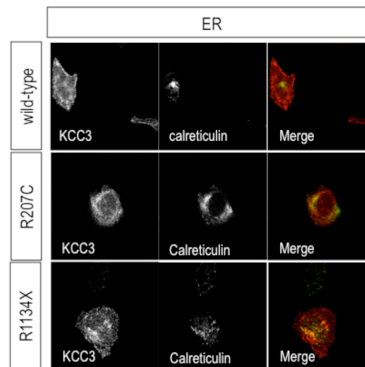


Figure 6

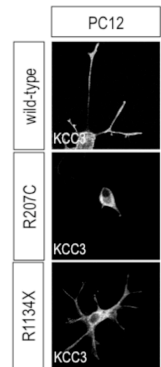
a.



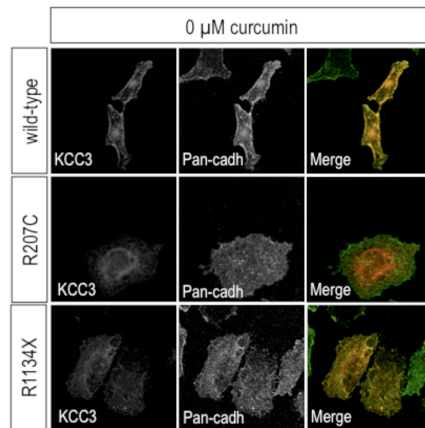
b.



c.



d.



e.

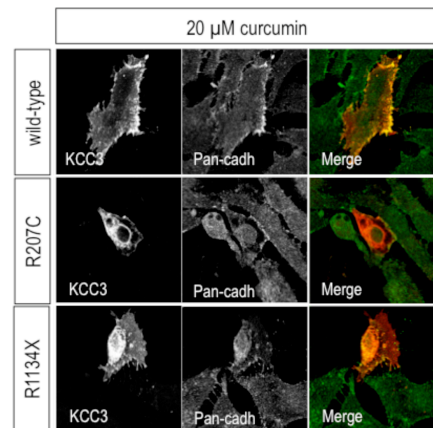
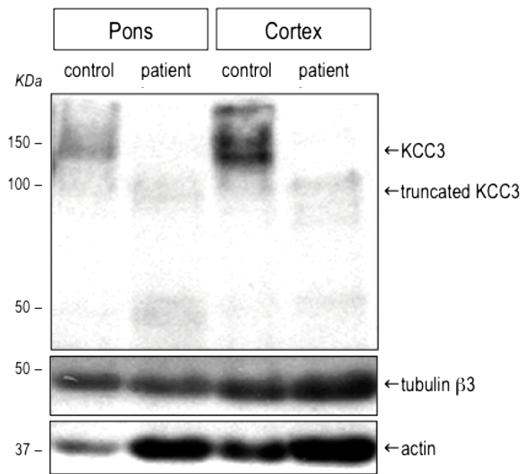


Figure 7

a.



b.

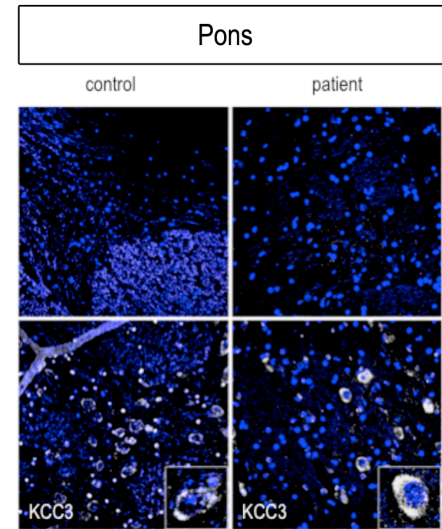


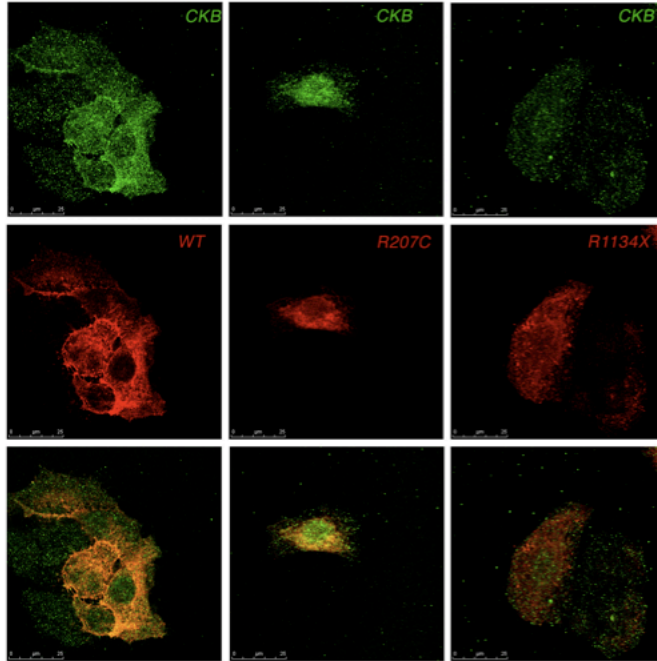
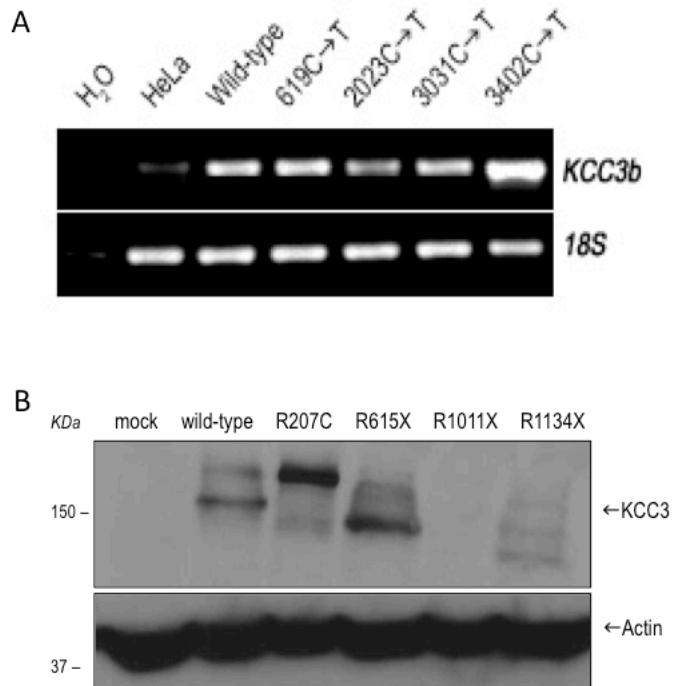
Figure S1

Figure S2

REFERENCES

- 1 Dupre, N., Howard, H.C., Mathieu, J., Karpati, G., Vanasse, M., Bouchard, J.P., Carpenter, S. and Rouleau, G.A. (2003) Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol*, **54**, 9-18.
- 2 Howard, H.C., Mount, D.B., Rochefort, D., Byun, N., Dupre, N., Lu, J., Fan, X., Song, L., Riviere, J.B., Prevost, C. *et al.* (2002) The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet*, **32**, 384-392.
- 3 Gamba, G. (2005) Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev*, **85**, 423-493.
- 4 Salin-Cantegrel, A., Riviere, J.B., Dupre, N., Charron, F.M., Shekarabi, M., Karemera, L., Gaspar, C., Horst, J., Tekin, M., Deda, G. *et al.* (2007) Distal truncation of KCC3 in non-French Canadian HMSN/ACC families. *Neurology*, **69**, 1350-1355.
- 5 Uyanik, G., Elcioglu, N., Penzien, J., Gross, C., Yilmaz, Y., Olmez, A., Demir, E., Wahl, D., Scheglmann, K., Winner, B. *et al.* (2006) Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology*, **66**, 1044-1048.
- 6 Salin-Cantegrel, A., Shekarabi, M., Holbert, S., Dion, P., Rochefort, D., Laganriere, J., Dacal, S., Hince, P., Karemera, L., Gaspar, C. *et al.* (2008) HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K⁺/Cl⁻ co-transporter 3. *Hum Mol Genet*, **17**, 2703-2711.
- 7 Simard, C.F., Bergeron, M.J., Frenette-Cotton, R., Carpentier, G.A., Pelchat, M.E., Caron, L. and Isenring, P. (2007) Homooligomeric and heterooligomeric associations between K⁺-Cl⁻ cotransporter isoforms and between K⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters. *J Biol Chem*, **282**, 18083-18093.
- 8 Smit, L.S., Strong, T.V., Wilkinson, D.J., Macek, M., Jr., Mansoura, M.K., Wood, D.L., Cole, J.L., Cutting, G.R., Cohn, J.A., Dawson, D.C. *et al.* (1995) Missense mutation

(G480C) in the CFTR gene associated with protein mislocalization but normal chloride channel activity. *Hum Mol Genet*, **4**, 269-273.

9 Egan, M.E., Pearson, M., Weiner, S.A., Rajendran, V., Rubin, D., Glockner-Pagel, J., Canny, S., Du, K., Lukacs, G.L. and Caplan, M.J. (2004) Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science*, **304**, 600-602.

10 Lu, M., Leng, Q., Egan, M.E., Caplan, M.J., Boulpaep, E.L., Giebisch, G.H. and Hebert, S.C. (2006) CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. *J Clin Invest*, **116**, 797-807.

11 Shen, M.R., Chou, C.Y., Hsu, K.F., Hsu, Y.M., Chiu, W.T., Tang, M.J., Alper, S.L. and Ellory, J.C. (2003) KCl cotransport is an important modulator of human cervical cancer growth and invasion. *J Biol Chem*, **278**, 39941-39950.

12 Nezu, A., Parvin, M.N. and Turner, R.J. (2009) A conserved hydrophobic tetrad near the C terminus of the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter (NKCC1) is required for its correct intracellular processing. *J Biol Chem*, **284**, 6869-6876.

13 Berger, A.L., Randak, C.O., Ostedgaard, L.S., Karp, P.H., Vermeer, D.W. and Welsh, M.J. (2005) Curcumin stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activity. *J Biol Chem*, **280**, 5221-5226.

14 Harada, K., Okiyonedo, T., Hashimoto, Y., Oyokawa, K., Nakamura, K., Suico, M.A., Shuto, T. and Kai, H. (2007) Curcumin enhances cystic fibrosis transmembrane regulator expression by down-regulating calreticulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **353**, 351-356.

15 Lipecka, J., Norez, C., Bensalem, N., Baudouin-Legros, M., Planelles, G., Becq, F., Edelman, A. and Davezac, N. (2006) Rescue of DeltaF508-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) by curcumin: involvement of the keratin 18 network. *J Pharmacol Exp Ther*, **317**, 500-505.

16 Xiong, L., Catoire, H., Dion, P., Gaspar, C., Lafreniere, R.G., Girard, S.L., Levchenko, A., Riviere, J.B., Fiori, L., St-Onge, J. *et al.* (2009) MEIS1 intronic risk

haplotype associated with restless legs syndrome affects its mRNA and protein expression levels. *Hum Mol Genet*, **18**, 1065-1074.

17 Leduc-Nadeau, A., Lahjouji, K., Bissonnette, P., Lapointe, J.Y. and Bichet, D.G. (2007) Elaboration of a novel technique for purification of plasma membranes from *Xenopus laevis* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, C1132-1136.

Article 4

Implication physiologique du co-transporteur de potassium-chlore 3 dans l'intégrité des nerfs

KCC3 est le principal transporteur sensible à l'hypotonicité qui est exprimé dans le système nerveux. Chez l'humain, la perte de fragments C-terminaux conduit à la NSMH/ACC. L'inactivation de KCC3 dans la NSMH/ACC ainsi que l'invalidation chez la souris se traduisent par du gonflement axonal, de l'hypomyélination et ultimement de la mort neuronale. L'implication de KCC3 dans cette maladie neurodégénérative sévère et progressive a souligné l'importance des co-transporteurs de cation-chlore dans la maintenance de l'intégrité des systèmes nerveux central et périphérique, mais aussi dans le développement du système nerveux central.

Ce travail intitulé 'Potassium-chloride co-transporter 3 and nerve dysfunction' a pour intérêt de décrire en quoi KCC3 influence le bon fonctionnement du système nerveux. Il relate en détail les différents aspects (expression, fonction, maladies et modèles animaux) qui montrent le rôle de KCC3 dans le système nerveux et correspond à une review en préparation. Cet article complète également le chapitre d'*Introduction* de cette thèse.

Implication des auteurs :

Salin-Cantegrel A : conception et rédaction de l'article

Rasheed S : participation à la correction du manuscrit

Rouleau GA : supervision et direction du projet

TITLE PAGE**Title :**

Potassium-chloride cotransporter 3 and nerve dysfunction

Authors :

Adele Salin-Cantegrel¹, Sarah Rasheed¹, Guy A. Rouleau^{1*}

¹Centre of Excellence in Neuromics, CHUM Research Centre - Notre-Dame Hospital and University of Montreal, Montreal, H2L 4M1, Canada.

*Corresponding author

Centre of Excellence in Neuromics of University of Montreal, CHUM Research Center and the Department of Medicine, University of Montreal

2099, rue Alexandre-De-Seve, Y-3633

Montreal (Quebec) H2L 2W5

Abstract

The potassium-chloride cotransporter 3 (KCC3) is the main swelling-inducible transporter of the nervous system. Missense, splice and C-terminal truncation mutations in the *KCC3* gene cause an autosomal recessive disorder called the hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC). *Kcc3* knock-out mice show axonal swelling, hypomyelination and neuronal cell death, in a similar fashion to what is observed in central and peripheral nervous systems of HMSN/ACC patients. Thus, KCC3 involvement in this severe neurodegenerative and neurodevelopmental disorder has revealed the fundamental role of the cation-chloride cotransporters in the maintenance of the integrity of the peripheral nervous system and the development of the central nervous system.

Key words: hereditary neuropathy, swelling, neurodegeneration, neurodevelopment, ACC.

The structure of KCC3

The search for members of the SLC12 family, especially those functionally related to KCC1, led to the cloning and characterization of the potassium-chloride cotransporter 3 (KCC3) in 1999 (Hiki et al. 1999, Mount et al. 1999, Race et al. 1999). Although structural predictions were limited in their resolution at the time, it is established that the protein possesses a membrane topology with a central core of twelve membrane-spanning segments flanked by large cytoplasmic amino- and carboxy-terminal domains (Hiki et al. 1999, Mount et al. 1999, Race et al. 1999) (Figure 1).

The transmembrane domains

The lipophilic core of the K^+/Cl^- cotransporter is involved in potassium and chloride affinity and based on structure-function studies from other SLC12 members, of the twelve transmembrane domains (TM), TM2, TM4 and TM7 probably participate in this activity (Mount DB and Gamba 2001, Lauf PK and Adragna NC 2004). Interestingly, pathological mutations in HMSN/ACC mutations seem to predominantly target the TM7 domain (Figure 1).

A highly glycosylated extracellular loop containing four N-glycosylation consensus sites lays between the 5th and 6th membrane-spanning segments (Hiki et al. 1999, Mount et al. 1999, Race et al. 1999, Howard et al. 2002). This loop may be involved in the quality control of KCC3 sorting and folding.

The amino terminal domain

KCC3 distinguishes itself from other KCCs not only because of its enrichment in the nervous system, but also in its considerable amino-terminal variability that give rise to tissue-specific isoforms. At least five N-terminus variants are generated from the *KCC3* gene via alternative transcriptional initiation sites that flank the two first coding exons (KCC3a and KCC3b). This is achieved through mRNA splicing at an internal acceptor site

within exon 1a (KCC3a-S1, KCC3a-S2 and KCC3a-S3) and through the alternative splicing of exon 2 (KCC3a-x2M and KCC3b-x2M) (Mercado et al. 2005). KCC3a is the predominant isoform expressed in the central and peripheral nervous systems, however KCC3a-x2M is also significantly expressed in the brain, suggesting that the alternative splicing of exon 2 may have a biological role in the CNS (Mercado et al. 2005, Le Rouzic et al. 2006). It is worth noting also that the nervous system isoforms bear numerous phosphorylation sites with potential functional relevance and which are absent from the KCC3b-isoforms (Mercado et al. 2005, Le Rouzic et al. 2006).

The carboxy-terminal domain

At the other end of the protein lays a sizeable and highly conserved carboxy-terminal domain (Mount et al. 1999, Race et al. 1999, Figure 1). Its importance for the co-transporter activity is supported by the fact that deletions of C-terminal portions of the protein or the addition of epitopes to the C-terminus totally abolish KCC3 function (Mount et al. 1999, Howard et al. 2002, Hiki et al. 1999, Figure 2). In contrast, the structure of the N-terminal domain is likely to be less functionally relevant than that of the C-terminus due to the variability at the amino-terminus and as the activity of the protein is not affected with the addition of N-terminal tags. The C-terminus is also the predominant target of pathogenic mutations in the hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (see Figure 1 and paragraphe 5 for details). Finally, the carboxy-terminal domain has proved to be essential for protein partners interactions (Casula et al. 2001, Salin-Cantegrel et al. 2008) as well as the assembly of quaternary structures (homo- and heterodimers) with members of the KCC family (Simard et al. 2007, Casula et al. 2009).

KCC3 expression in mammalian the nervous system

While KCC3 is widely expressed, its expression is not ubiquitous (Boettger et al. 2003, Hiki et al. 1999, Lauf et al. 2001, Race et al. 1999, Mount et al. 1999, Davies et al. 2004)

suggesting that unlike KCC1, KCC3 does not serve a housekeeping function. In addition, the robust expression of KCC3 in the developing and mature nervous system supports the notion that it plays a critical role in nerve and glial cell integrity (Hiki et al. 1999, Mount et al. 1999, Race et al. 1999, Ringel et al. 2008, Neurosci Lett).

KCC3 expression during the nervous system development.

During embryonic development, trace amounts of KCC3 mRNA can be detected in differentiating regions of the immature nervous system within the isocortical preplate of the telencephalon, the mesencephalon and the rhombencephalon. In later stages of brain development, this K^+/Cl^- cotransporter demonstrates increased expression levels in the cortical plate and the developing hippocampus (Li et al. 2002). However, it is not until postnatal maturation that KCC3 begins to show strong expression within neurons in the central nervous system (Pearson et al. 2001, Byun and Delpire, 2007). Expression within the peripheral nervous system begins postnatally and persists throughout development into adulthood (Li et al. 2002, Boettger et al. 2003, Byun and Delpire, 2007). It is worth noting that this expression pattern correlates well with the early onset peripheral neuropathy observed in patients with HMSN/ACC.

KCC3 expression in the adult nervous system

Within the mature mammalian nervous system, KCC3 staining can be observed in the cell body, axons and synapses of neurons located within the hippocampus, the cortex, the brainstem and the cerebellum (Howard et al. 2002, Pearson et al. 2001, Boettger et al. 2003). While all studies on KCC3 have thus far agreed that it is abundantly expressed in the cerebral cortex, hippocampus, diencephalon, brainstem, and cerebellum (Pearson et al. 2001, Howard et al. 2001, Boettger et al. 2003, Le Rouzic et al. 2006), certain aspects of its expression pattern remain a controversy. In particular, Pearson and colleagues reported KCC3 expression in the corpus callosum as well as in white matter tracts of the internal and

external capsules, which was then contradicted by Boettger who reported that these regions lack KCC3 staining (Boettger et al. 2003).

KCC3 function in the nervous system

Given the role of most SLC12 family members, KCC3 is likely to be involved in the transepithelial co-transport of potassium and chloride within the nervous system. However, it has also been proposed that KCC3 could act in other processes such as axonal and neuronal protection from osmotic insults, myelin compaction during ensheathment and/or cellular proliferation and survival (Figure 3). In addition, the agenesis of the corpus callosum in HMSN/ACC strongly suggest that KCC3 might also play a role in the nervous system development.

Ion homeostasis

Disequilibrium of osmotically active molecules across the plasma membrane triggers the passive flux of water to balance the osmotic pressure gradient. Cells have developed a series of mechanisms against osmotic shock to achieve a regulatory volume decrease through the efflux of intracellular ions, involving the potassium-chloride co-transport. The driving force of KCC3 co-transport is outward, from the cell to the extracellular environment, which uses the chemical energy in the gradient of one ion to co-transport the other against its gradient (Lauf and Adragna, 1996. Lauf et al. 2001). Given its role in ion flux, KCC3 is likely to be involved in the buffering of potassium and chloride concentration in neural cells and in the interstitial space within the brain. Furthermore, the co-transporter's strong expression in the choroid plexus, suggests that KCC3 participates in potassium re-absorption from cerebrospinal fluid, where potassium composition maintains the proper electrical activity in the brain.

Axonal volume regulation

While none of the KCC3 isoforms mediate co-transport under isotonic conditions, they are all strongly activated by cell swelling induced by hypotonicity (Mercado et al. 2005). In addition, knocking-out the *Kcc3* gene in mice results in dramatic axonal swelling, a hallmark in HMSN/ACC disease, in young *Kcc3*^{-/-} mice, volume recovery after osmotic insult was severely reduced in neurons whereas the adult showed partial recovery from the swelling (See Paragraphe 6 for more details). KCC3 is therefore crucially involved in neuronal regulatory volume decrease at early post-natal stages. Note that later on there are compensations by additional volume regulatory mechanisms in the adult nervous system (Boettger et al. 2003, Pearson et al. 2001).

It is a possibility that the normal activation of KCC3 fails to take place in the nervous system of children suffering from HMSN/ACC, resulting in axons or Schwann/oligodendrocytes cells becoming overly sensitive to local fluctuations in tonicity. As the pathology suggests that the site of disease initiation is in the white matter and the peripheral nerves, there is a possibility that the primary axonal membrane dysfunction with subsequent Schwann cell/oligodendrocyte dysfunction, or the reverse scenario, could both occur and induce the apparition of axonal swelling and neuronal death (Figure 3b).

Neuronal excitability

Although potassium-chloride co-transporters do not affect the membrane potential *Kcc2* knockout mice have seizures, *Kcc3* knockout mice present a diminution in their seizure susceptibility threshold (Boettger et al, 2003) and epilepsy has frequently been reported in HMSN/ACC individuals (Salin-Cantegrel et al, 2007). In addition, the neuronal and synaptic expression of KCC3 suggests a similar although less prominent role than KCC2 in neuronal chloride homeostasis. Thus, KCC3's role in the modulation of intracellular chloride may increase upon the neuronal cell swelling resulting from intense neuronal activity. As a consequence, neurons lacking KCC3 may have an altered excitability because of a decreased synaptic inhibition due to an excessive chloride concentration (Boettger et al. 2003). Therefore, KCC3 probably plays a role in the volume-

regulatory response to neuronal excitation such that loss of this function leads to neurodegeneration. However, because KCC3 does not mediate potassium-chloride co-transport under isotonic conditions, unlike KCC2, it is unlikely to regulate the baseline neuronal chloride activity.

Myelination

The presence of poorly myelinated nerve fibers in *Kcc3* knockout mice can be explained by anomalies in the myelination process. Some even suggested that KCC3 function was important for the myelination process due to its presence in white matter-rich structures during postnatal development (Pearson et al. 2001). KCC3 expression is low at birth and increases during postnatal development, following a similar expression pattern observed for myelin binding protein, a marker of myelin development. However, in early post-natal development, *Kcc3*^{-/-} schwann cells properly segregates with the axons and hypomyelination is not observed (Byun and Delpire, 2007).

Although myelination occurs, it seems that fluid accumulates in periaxonal space, or fails to be exported possibly due to knockout schwann cells inability to extrude ion/fluids. This fluid accumulation may ultimately disrupt axon-glia contacts necessary for their maintenance and survival and lead to the hypomyelination/demyelination of the nerve fibers similar to that observed in HMSN/ACC patients (Byun and Delpire, 2007).

Growth cone migration

HMSN/ACC is unique in the fact that it associates aspects of a neurodegenerative disorder with a those of a neurodevelopmental defect. Migration of the nerve fibers that connect the brain hemispheres is defective and Probst's bundles are generated due to the failure of axons to cross the midline, causing the axons to run longitudinally along the medial walls of the lateral ventricles (Carpenter et al. 1994, Howard et al. 2002).

The asymmetric distribution of ion transporters allows lamellipodium-like formations in the developing brain of vertebrates (Zierler et al. 2008) that participate in axonal migration

(Marin et al. 2006). Filopodia and lamellipodia are actually the first structures to encounter guidance cues during growth cone advance. Therefore, KCC3 may participate in the regulatory volume process that propels the growth cone and allow axonal migration. Mutations in the *KCC3* gene and the associated defect in axon migration support the idea that KCC3 protein might influence the early migration progress of axons in the developing brain. However, so far, no deficiencies were found in the total number of axons or the normal migration of axons in *Kcc3*^{-/-} mice brains and suggests that *Kcc3* is not key to the axon migration in mice (Byun and Delpire, 2007). Additional epigenetic and/or environmental factors play probably a pivotal role in the human corpus callosum dysgenesis in HMSN/ACC.

Regulation of KCC3 function

KCC3 is involved in the regulatory cell volume decrease (RVD response) and its function is primarily modulated by tonicity. For example, *Kcc3*^{-/-} neurons fail to respond properly to hypotonic conditions in culture, which attests for the swelling-dependent activation of KCC3 in neurons (Boettger et al. 2003) and its role in RVD. However, the swelling-induced activation was deficient in certain type of cells (NIH3T3 and HEK293) suggesting the absence of a functional modulator in fibroblasts and certain epithelial cells (Hiki et al. 1999, Shen et al. 2001).

Regulation through the N-terminus

The cotransporter is inhibited by phosphorylation (Lauf and Adragna, 2000), demonstrating a pivotal role for kinases and phosphatases in KCC3 regulation. It has been reported that the amino-terminus (Casula et al. 2001) interacts *in vitro* with the stress response actor SPAK (Ste20p-like proline-alanine rich kinase), allowing phosphorylative regulation of KCCs in *Xenopus* oocytes (Gagnon et al. 2006). The SPAK homolog in *Drosophila*, *fray*, is expressed in ensheathing glial cells and is required for nerve

myelination (Leiserson et al. 2000), which is affected in HMSN/ACC. However, SPAK does not interact with KCC1 and KCC4, which provide ‘house keeping’ functions, therefore this interaction is unlikely to play a role in cell volume regulation (Piechotta et al. 2002). Further support for the notion that the SPAK protein interaction is not critical for KCC3 function is given by the fact that the modulation of SPAK expression has no specific effects on KCC3 activity in *Xenopus* oocytes (Garzon-Muvdi et al. 2006).

On the other hand, the WNK family of kinases seems to be important to KCC3 regulation. In cultured cells and human red blood cells, threonine residues T991 and T1048 are highly phosphorylated under isotonic conditions but rapidly undergo a dephosphorylation under hypotonic conditions resulting in activation of the co-transporter. Reduction of WNK1 expression via RNAi reduces the phosphorylation of these residues (Rinehart J et al. 2009). Interestingly, WNK4 is also a known negative regulator of KCCs that partially suppresses cell swelling-induced activation of KCC3 (Garzon-Muvdi et al. 2006) while WNK3 can totally inhibit KCC3 function during cell swelling (De Los Heros et al. 2006).

Regulation through the C-terminus

The carboxy-terminal domain is crucial for the potassium-chloride co-transporter’s activity supported by the fact that in the HMSN/ACC disease the carboxy-terminus is a main target of naturally-occurring mutations (Howard et al. 2002, Salin-Cantegrel et al. 2007). In that regard, KCC3 inactivation may be attributed to disruption of C-terminal interactions with functional protein partners. We have demonstrated that the brain-type creatine kinase directly binds to the last 18 amino-acids of KCC3. This distal peptide sequence is lost in all truncating HMSN/ACC mutations reported to date suggesting that CK-B fails to interact with all truncated forms of KCC3. In addition, CK-B activity is required for proper activation of the co-transporter, indicating that CK-B function is critical for KCC3 activation in the nervous system (Salin-Cantegrel et al. 2008, Figure 2). Given that the C-terminus comprises about 400 amino acids, we do not exclude that other C-terminal partners remain to be identified.

Other

KCC2 and KCC3 are both enriched in the nervous system and are highly homologous (amino acid identity of 67%). In that regard, known partners for KCC2 are interesting candidate partners for KCC3. For instance, CK-B can interact with both KCC3 and KCC2.

It has been shown that CIP1, the cation-chloride cotransporter interacting protein 1 interacts with KCC2 due to the ability of CIP1 to heterodimerize with KCC partners (Wenz et al. 2009). This CIP1/KCC2 interaction increases the co-transporter's activity. It remains a possibility that CIP1 might have similar effects on other KCCs, including KCC3. In addition, CIP1 enrichment in the nervous system, especially during the early post-natal stages when KCC3 function is so crucial, makes it a very promising potential partner (Wenz et al. 2009).

Potassium-chloride co-transporter 3 in nervous system diseases

The *KCC3* gene maps to the chromosomic region 15q13-14, a region linked to hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC) as well as two subtypes of idiopathic generalized epilepsy, a neurophysiological phenotype associated with schizophrenia, and a allelic recessive disorder of familial spastic paraparesis.

HMSN/ACC

Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum (HMSN/ACC), also called agenesis of the corpus callosum with peripheral neuropathy (ACCPN) or Andermann syndrome, is an autosomal recessive disease that occurs most frequently in the French-Canadian population of the Saguenay-Lac-St-Jean region and Charlevoix County where its incidence at birth is estimated at 1/2117 (Braekeleer et al.

1993). HMSN/ACC is a severe peripheral neuropathy caused by axonal swelling (a degenerative condition) and central nervous system malformation (corpus callosum hypoplasia suggestive of defective axonal migration during embryogenesis). Its manifestations appear during the first years of life with delayed or absent achievement in developmental milestones and slow development of the motor functions. Consequently patients are only able to stand or walk with support by the age of 4-6 years. Later occurs a progressive neurodegenerative process so that the majority of subjects become wheelchair-bound by the age of 15 years. There is areflexia, striking dysmorphic features, mild to moderate mental retardation, convulsions and for most of HMSN/ACC patients speech abilities develop but these are dysarthric (Andermann et al. 1972 , Andermann et al. 1975 , Dupre et al. 2003). Neurophysiological examinations revealed reduction of the motor nerve conduction velocity, absence of sensory nerve action potentials, and abnormal somatosensory and visual evoked potentials. A third of HMSN/ACC patients develop neuropsychiatric syndromes, with visual and auditory hallucinations as well as paranoid delusions, suggesting a progression in the involvement of the central nervous system in the disease as well (Filteau et al. 1991). Patients commonly die around 33 years old of complications from respiratory infections. It was reported that here is total agenesis of the corpus callosum in about 60%, partial agenesis in 10% and no obvious agenesis in 30% of HMSN/ACC cases (Mathieu et al. 1990). Neither the significance nor the causes of the variable involvement of the corpus callosum are known and the natural course and features of the disease do not vary significantly between individuals with or without signs of agenesis (Dupre et al. 2003). Nerve biopsies demonstrated an absence of myelin around the largest axons whereas moderately enlarged axons had abnormally thin sheaths, numerous onion bulb formations, axonal swelling due to increased fluid in the axonoplasm, axonal loss with increased packing density of oligodendroglial cells and proliferation of astrocytes (Dupre et al. 2003). Pathological findings altogether suggest that the primary defect in HMSN/ACC is at the level of the white matter and peripheral nerves. All these aspects are reminiscent of the phenotype found in *Kcc3*^{-/-} mice (refer to Paragraphe 6 for details).

To date, 12 mutations in the *KCC3* gene have been found in patients of French-Canadian (Howard, 2002), Dutch (Salin-Cantegrel 2007), German (Uyanik 2006), Italian (Howard, 2002), Sudanese (Salin-Cantegrel 2007), South African (Salin-Cantegrel 2007), Turkish (Howard, 2002, Uyanik 2006, Salin-Cantegrel 2007) and Algerian descents (unpublished data): 10 of these introduce a premature stop codon that lead to a truncated protein. Of particular interest are some mutations identified in non-French-Canadian families: a truncating mutation in exon 22 (R1011X) segregating in pedigrees from Turkey, Holland and South-Africa and which results in the loss of the last 140 amino acids (32 %) of *KCC3*, a non-truncating missense mutation in exon 5 (R207C) in a Turkish family and another missense mutation in exon 10 (G539D) (Rudnik-Schoneborn et al. 2009). It should also be noted that an increased incidence of epilepsy was found in patients bearing the distal truncations and that the phenotypic presentation was less severe in patients carrying missense mutations (Salin-Cantegrel et al. 2007, Uyanik et al. 2006, unpublished data). The notion is thus emerging that distinct *KCC3* mutations may lead to variable HMSN/ACC phenotypes. Refer to Figure 1 and Table 1 for a detailed review of the mutations.

Bipolar disorders

Many bipolar disorders have been linked to the 15q13-15 chromosome region containing the *KCC3* gene. An hereditary schizophrenia (Gejman et al. 2001), periodic catatonia or SCZD10 type of schizophrenia (Meyer et al. 2002a), schizophrenia combined with neurophysiological trait or P50 auditory event-evoked potential inhibition deficit (Freedman et al. 1997) and lithium-responsive bipolar disorder (Turecki et al. 2001) have all been linked to the chromosome 15. Sequencing of *KCC3* promotor region and introns in patients with schizophrenia of periodic catatonia type revealed three variants. A 32416574(G/A) polymorphism in the 5' UTR and a IVS4+1008ins(T) insertion in intron 4 of the *KCC3* gene co-segregate with the disease (Meyer et al. 2005). However, a (32418760(G/A) variant in *KCC3* promotor most strongly associated with schizophrenia

and is responsible for altered activity of KCC3 promotor (Moser et al. 2008). The polymorphism is localized within a CpG-rich island and might result in differential methylation of *KCC3* gene promotor region. Fluctuation in KCC3 level of expression might therefore result in bipolar disorders manifestation.

Epilepsy

Significant linkage to chromosomic region 15q14 was found for the EEG trait 'centrotemporal spikes' in families with rolandic epilepsy (Neubauer et al. 1998) and with juvenile myoclonic epilepsy (JME) (Elmslie et al. 1997). In addition, fibrillations are found in 23% of patients with *KCC3* mutations and polyphasic to giant potentials have been reported in 25% of French-Canadian HMSN/ACC patients (Dupre et al. 2003, Salin-Cantegrel et al. 2007). Interestingly, *KCC2* (and *NKCC1*) has been strongly linked to epilepsy. *KCCs* dysfunction is likely to increase intracellular chloride concentration, leading to reduced hyperpolarizing inhibitory GABA response and hyperexcitability. Blockade of cation-chloride co-transporters increases the ceiling level of extracellular potassium during induced epileptiform activity in rat hippocampal slices (Xiong and Stringer 2000), In addition, aberrant function and maturation of cation-chloride co-transporters during embryonic development can disturb glycinergic and GABAergic synaptic transmission (Kakazu et al. 1999). In IGE and rolandic epilepsy patients novel SNPs were identified within *KCC3* exons, however they did not change the coding sequence (Steinlein et al. 2001). It is also worth noting that epilepsy often entails neurodegeneration, neurons that have loss their ability to regulate their volume could be particularly vulnerable and over-sensitive to the changes in ion concentrations that occur during neuronal activity.

Neuropathy in *Kcc3*^{-/-} animal models

All invalidations of *Kcc3* gene in mouse result in a complex neurological phenotype (Figure 4). At two weeks of age, *Kcc3*^{-/-} pups have no apparent locomotor and behavioural phenotype. But at three weeks of age, the knock-out mice exhibit motor and postural abnormalities with abnormal hind limb grasp responses. In knockout mice older than 1 year, the defects extend to their forelegs and the animals are unable to move their hind limbs. Surprisingly, all knockout mouse models fail to develop morphological changes in the corpus callosum, suggesting that the neurodevelopmental defect is unrelated to neurodegeneration and that epigenetic or environmental factors are most likely involved.

Animal model 1 : Howard et al. 2001

In the earliest mouse model, the authors focused mainly on the degenerative aspects in the peripheral nerves. Beginning at post-natal day 8, the fibers in mutant nerves were significantly enlarged due to fluid filling the periaxonal space. This led to a myelin deterioration at post-natal day 20 revealed by thinly myelinated axons, myelin deposits, hypomyelination, myelin decompaction, demyelination and fiber degeneration in the sciatic nerves. In adult sciatic nerves, denervation left behind Bungner bands (arrays of Schwann cell processes that provide a substrate for regenerating axons) and Wallerian degeneration (a marker of dying-back of axons after injury). The degenerative process is followed by regrowth of new axons through the neural tube in the peripheral nervous system. In brains from heterozygote *Kcc3* knockout mice, there was a significant reduction of *Kcc3* expression, and the mice exhibited reduced exploration and intermediate phenotypes in the PPI task. This gene dosage effect in the heterozygote litter supports data suggesting that the *KCC3* promoter has reduced activity in bipolar disorders (Moser et al. 2008). However, HMSN/ACC is a recessive disorder and parents possessing only one functional *KCC3* copy do not show a clinical phenotype.

Animal model 2 : Boettger et al, 2003

In this mouse model, degeneration was described both in the peripheral and central nervous systems, in particular in the white matter tracts. The analysis of sciatic nerves as well as the ventral and dorsal roots of the spinal cord indicated that axons of both motor neurons and sensory neurons degenerated. Neuronal degeneration in several fiber tracts of the central nervous system was also observed, including in the outer molecular layer of the dentate gyrus along the hippocampus fissure and in the cerebellum, possibly explaining the mental retardation in HMSN/ACC affected individuals. The severe degeneration in the peripheral nervous system and in several areas of the central nervous system occurs postnatally and therefore cannot be explained by an impaired development. The neurodegeneration was progressive and correlated with the increasing severity of the motor phenotype in HMSN/ACC. Additional features have been reported in this model, although they do not correlate to clinical manifestations that are systematically observed : (1) The neuronal excitability was modified. Latency until the onset of induced convulsions was significantly shortened although no spontaneous seizures were observed. The changes in seizure threshold may reflect the seizures and EEG activities seen in some HMSN/ACC patients. (2) The sense of hearing appeared affected. Auditory brainstem response showed that homozygote knockout mice slowly lost their hearing over the first year. This hearing loss correlates with degeneration in the cochlea. Given the slow development of deafness in mice, it is possible that HMSN/ACC patients might display hearing loss only later in life however their shortened life-expectancy prevents detection of this symptom. (3) Finally, the knockout mice have chronic arterial hypertension likely due to a neurogenic component with increased sympathetic nerve activity (Rust et al. 2006).

Animal model 3 : Jiao et al. 2008

Gaxp mice with a giant axonopathy phenotype (gaxp) emerged from a mutant strain that arose spontaneously in the laboratory. A seventeen nucleotide deletion in *Kcc3* predicted to lead to an early stop codon that eliminates the twelve transmembrane domains as well as the carboxy-terminus, lead to the gaxp phenotype. However no trace of *Kcc3*

protein, either truncated or full length, was detected on western-blot. The mice exhibited ataxia of the hind legs with a slight side-to-side wobble while walking that was related to swollen axons in the *gaxp/gaxp* nervous system.

Conclusion

The key participation of the potassium-chloride co-transporters in nervous system maintenance, integrity, proper functioning and development came as a surprise a decade ago. However, the development of disease models has led to an enormous improvement of our understanding not only to HMSN/ACC pathogenesis, but also KCC3 function in the PNS and CNS. Although no treatment is available for HMAN/ACC, understanding the mechanisms to which KCC3 causes neurodegeneration may help establish a therapeutic approach aimed at delaying the onset, altering the progression, ameliorating the symptoms or even curing this severe and progressive neuropathy.

References

- Andermann, E. (1981). Sensorimotor neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Handbook of clinical neurology*, 42(Ed Vinken PJ).
- Andermann, E. e. a. (1979). Familial agenesis of the corpus callosum with sensorimotor neuropathy: Genetic and epidemiological studies of over 170 patients. *Can J Neurol Sci*, 6, 400.
- Andermann, F., Andermann, E & Joubert, M. (1972). Familial agenesis of the corpus callosum with anterior horn cell disease: a syndrome of mental retardation, areflexia and paraparesis. *Trans Am Neurol Assoc*, 1972, 242-244.
- Alvarez-Leefmans, F. J., Leon-Olea, M., Mendoza-Sotelo, J., Alvarez, F. J., Anton, B., & Garduno, R. (2001). Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience*, 104(2), 569-582.

- Bergeron, M. J., Gagnon, E., Caron, L., & Isenring, P. (2006). Identification of key functional domains in the C terminus of the K⁺-Cl⁻ cotransporters. *J Biol Chem*, *281*(23), 15959-15969.
- Boettger, T., Rust, M. B., Maier, H., Seidenbecher, T., Schweizer, M., Keating, D. J., et al. (2003). Loss of K-Cl co-transporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J*, *22*(20), 5422-5434.
- Byun, N., & Delpire, E. (2007). Axonal and periaxonal swelling precede peripheral neurodegeneration in KCC3 knockout mice. *Neurobiol Dis*, *28*(1), 39-51.
- De Braekeleer, M., Dallaire, A., & Mathieu, J. (1993). Genetic epidemiology of sensorimotor polyneuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in northeastern Quebec. *Hum Genet*, *91*(3), 223-227.
- de Los Heros, P., Kahle, K. T., Rinehart, J., Bobadilla, N. A., Vazquez, N., San Cristobal, P., et al. (2006). WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(6), 1976-1981.
- Delpire, E., & Mount, D. B. (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol*, *64*, 803-843.
- Dupre, N., Howard, H. C., Mathieu, J., Karpati, G., Vanasse, M., Bouchard, J. P., et al. (2003). Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol*, *54*(1), 9-18.
- Elmslie, F. V., Rees, M., Williamson, M. P., Kerr, M., Kjeldsen, M. J., Pang, K. A., et al. (1997). Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q. *Hum Mol Genet*, *6*(8), 1329-1334.
- Filteau, M. J., Pourcher, E., Bouchard, R. H., Baruch, P., Mathieu, J., Bedard, F., et al. (1991). Corpus callosum agenesis and psychosis in Andermann syndrome. *Arch Neurol*, *48*(12), 1275-1280.
- Garzon-Muvdi, T., Pacheco-Alvarez, D., Gagnon, K. B., Vazquez, N., Ponce-Coria, J., Moreno, E., et al. (2007). WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, *292*(4), F1197-1207.

- Gejman, P. V., Sanders, A. R., Badner, J. A., Cao, Q., & Zhang, J. (2001). Linkage analysis of schizophrenia to chromosome 15. *Am J Med Genet*, *105*(8), 789-793.
- Hiki, K., D'Andrea, R. J., Furze, J., Crawford, J., Woollatt, E., Sutherland, G. R., et al. (1999). Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem*, *274*(15), 10661-10667.
- Howard, H. C., Mount, D. B., Rochefort, D., Byun, N., Dupre, N., Lu, J., et al. (2002). The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet*, *32*(3), 384-392.
- Jiao, Y., Jin, X., Yan, J., Zhang, C., Jiao, F., Li, X., et al. (2008). A deletion mutation in Slc12a6 is associated with neuromuscular disease in gaxp mice. *Genomics*, *91*(5), 407-414.
- Larbrisseau, A., Vanasse, M., Brochu, P., & Jasmin, G. (1984). The Andermann syndrome: agenesis of the corpus callosum associated with mental retardation and progressive sensorimotor neuronopathy. *Can J Neurol Sci*, *11*(2), 257-261.
- Lauf, P. K., & Adragna, N. C. (1996). A thermodynamic study of electroneutral K-Cl cotransport in pH- and volume-clamped low K sheep erythrocytes with normal and low internal magnesium. *J Gen Physiol*, *108*(4), 341-350.
- Lauf, P. K., & Adragna, N. C. (2000). K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem*, *10*(5-6), 341-354.
- Lauf, P. K., Zhang, J., Delpire, E., Fyffe, R. E., Mount, D. B., & Adragna, N. C. (2001). K-Cl cotransport: immunocytochemical and functional evidence for more than one KCC isoform in high K and low K sheep erythrocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, *130*(3), 499-509.
- Le Rouzic, P., Ivanov, T. R., Stanley, P. J., Baudoin, F. M., Chan, F., Pinteaux, E., et al. (2006). KCC3 and KCC4 expression in rat adult forebrain. *Brain Res*, *1110*(1), 39-45.
- Leiserson, W. M., Harkins, E. W., & Keshishian, H. (2000). Fray, a Drosophila serine/threonine kinase homologous to mammalian PASK, is required for axonal ensheathment. *Neuron*, *28*(3), 793-806.
- Li, H., Tornberg, J., Kaila, K., Airaksinen, M. S., & Rivera, C. (2002). Patterns of cation-chloride

- cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci*, 16(12), 2358-2370.
- Mercado, A., Vazquez, N., Song, L., Cortes, R., Enck, A. H., Welch, R., et al. (2005). NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(6), F1246-1261.
- Meyer, J., Johannssen, K., Freitag, C. M., Schraut, K., Teuber, I., Hahner, A., et al. (2005). Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8(4), 495-504.
- Meyer, J., Ortega, G., Schraut, K., Nurnberg, G., Ruschendorf, F., Saar, K., et al. (2002). Exclusion of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene as a candidate for catatonic schizophrenia in a large family supporting the chromosome 15q13-22 locus. *Mol Psychiatry*, 7(2), 220-223.
- Moser, D., Ekawardhani, S., Kumsta, R., Palmason, H., Bock, C., Athanassiadou, Z., et al. (2009). Functional analysis of a potassium-chloride co-transporter 3 (SLC12A6) promoter polymorphism leading to an additional DNA methylation site. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 458-467.
- Mount, D. B., Delpire, E., Gamba, G., Hall, A. E., Poch, E., Hoover, R. S., et al. (1998). The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J Exp Biol*, 201(Pt 14), 2091-2102.
- Mount, D. B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A. L., Jr., Delpire, E., et al. (1999). Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem*, 274(23), 16355-16362.
- Neubauer, B. A., Fiedler, B., Himmelein, B., Kampfer, F., Lassker, U., Schwabe, G., et al. (1998). Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. *Neurology*, 51(6), 1608-1612.
- Orlov, S. N., Kolosova, I. A., Cragoe, E. J., Gurlo, T. G., Mongin, A. A., Aksentsev, S. L., et al. (1993). Kinetics and peculiarities of thermal inactivation of volume-induced Na⁺/H⁺ exchange, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport and K⁺,Cl⁻ cotransport in rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1151(2), 186-192.

- Pearson, M. M., Lu, J., Mount, D. B., & Delpire, E. (2001). Localization of the K(+)-Cl(-) cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience*, *103*(2), 481-491.
- Piechotta, K., Lu, J., & Delpire, E. (2002). Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem*, *277*(52), 50812-50819.
- Race, J. E., Makhlouf, F. N., Logue, P. J., Wilson, F. H., Dunham, P. B., & Holtzman, E. J. (1999). Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol*, *277*(6 Pt 1), C1210-1219.
- Rinehart, J., Maksimova, Y. D., Tanis, J. E., Stone, K. L., Hodson, C. A., Zhang, J., et al. (2009). Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell*, *138*(3), 525-536.
- Rudnik-Schoneborn, S., Hehr, U., von Kalle, T., Bornemann, A., Winkler, J., & Zerres, K. (2009). Andermann syndrome can be a phenocopy of hereditary motor and sensory neuropathy--report of a discordant sibship with a compound heterozygous mutation of the KCC3 gene. *Neuropediatrics*, *40*(3), 129-133.
- Rust, M. B., Alper, S. L., Rudhard, Y., Shmukler, B. E., Vicente, R., Brugnara, C., et al. (2007). Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. *J Clin Invest*, *117*(6), 1708-1717.
- Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didie, M., et al. (2006). Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res*, *98*(4), 549-556.
- Sachs, J. R., & Martin, D. W. (1999). Role of polyamine structure in inhibition of K⁺-Cl⁻ cotransport in human red cell ghosts. *J Physiol*, *520 Pt 3*, 723-735.
- Salin-Cantegrel, A., Riviere, J. B., Dupre, N., Charron, F. M., Shekarabi, M., Karemera, L., et al. (2007). Distal truncation of KCC3 in non-French Canadian HMSN/ACC families. *Neurology*, *69*(13), 1350-1355.
- Salin-Cantegrel, A., Shekarabi, M., Holbert, S., Dion, P., Rochefort, D., Laganiere, J., et al. (2008).

- HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K⁺/Cl⁻ co-transporter 3. *Hum Mol Genet*, 17(17), 2703-2711.
- Simard, C. F., Bergeron, M. J., Frenette-Cotton, R., Carpentier, G. A., Pelchat, M. E., Caron, L., et al. (2007). Homooligomeric and heterooligomeric associations between K⁺-Cl⁻ cotransporter isoforms and between K⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters. *J Biol Chem*, 282(25), 18083-18093.
- Steinlein, O. K., Neubauer, B. A., Sander, T., Song, L., Stoodt, J., & Mount, D. B. (2001). Mutation analysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic and idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res*, 44(2-3), 191-195.
- Turecki, G., Grof, P., Grof, E., D'Souza, V., Lebuis, L., Marineau, C., et al. (2001). Mapping susceptibility genes for bipolar disorder: a pharmacogenetic approach based on excellent response to lithium. *Mol Psychiatry*, 6(5), 570-578.
- Uyanik, G., Elcioglu, N., Penzien, J., Gross, C., Yilmaz, Y., Olmez, A., et al. (2006). Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology*, 66(7), 1044-1048.
- Wenz, M., Hartmann, A. M., Friauf, E., & Nothwang, H. G. (2009). CIP1 is an activator of the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2. *Biochem Biophys Res Commun*, 381(3), 388-392.

TABLES**Table** : List of HMSN/ACC mutations

Mutation	KCC3	Nature	Consequences	Mutant	Origin
619C→T	Exon 5	missense	Exchange of Arg for Cys in TM1	R207C	Turkey
901delA	Exon 7	frameshift	Loss of TM4 to TM12 and 100% of the CTD	F316X	Turkey
1118G→A	Exon 8	splicing	Loss of TM6 to TM12 and 100% of the CTD	F373X	
1478_1485delTTCCCTCT	Exon 10	frameshift	Loss of TM7 to TM12 and 100% of the CTD	A532X	Germany
1616G→A	Exon 11	missense	Exchange of Gly for Asp in TM7	G539D	
1584_1585delCTinsG	Exon 11	frameshift	Loss of TM7 to TM12 and 100% of the CTD	P541X	Canada
2023C→T	Exon 15	nonsense	Loss of TM12 and 100% of the CTD	R675X	Italy
2031_2032insT	Exon 15	frameshift	Loss of TM12 and 100% of the CTD	H719X	Germany
2436delG	Exon 18	splicing	Loss of 78% of the CTD	T813X	Canada
3031C→T	Exon 22	nonsense	Loss of 32% of the CTD	R1011X	Turkey Holland South-Africa
2994_3003delCCAGATGCTC	Exon 22	frameshift	Loss of 32% of the CTD	E1015X	Sudan
3402C→T*	Exon 25	nonsense	Loss of 4% of the CTD	R1134X	Algeria

*unpublished data ; TM: Transmembrane domain ; CTD : Carboxy-terminal domain

FIGURE LEGENDS

Figure 1: KCC3 structure and HMSN/ACC mutations. Predicted structure of the wild-type potassium-chloride cotransporter 3 and localisation of HMSN/ACC mutations within the protein. The missense mutation is indicated in green. The frameshift mutations are shown in black. The nonsense mutations are indicated in blue. The annotations correspond to the isoform KCC3a to allow consistency with previous publications.

Figure 2: Assessment of KCC3 activity and inhibition relative to water injected *Xenopus laevis* oocytes. *Xenopus* oocytes were injected with wild KCC3 isoforms (a or b) or the form lacking the C-terminus and subjected to different inhibitory conditions (Furosemide is a KCC inhibitor, DNFB is a CK-B inhibitor, and without Cl⁻) and the relative activity compared to water injected oocyte are indicated here (in A.U.). The error-bars indicate the standard deviation for at least three independent experiments.

Figure 3: Physiological roles of KCC3 in the nervous system. Schematic representation of proposed KCC3 roles in the nervous system development and maintenance.

Figure 4: *Kcc3* disruption in mouse and related phenotypes. Several phenotypes result from targeted disruption of the *Kcc3* gene. Total absence of *Kcc3* is associated with neurodegeneration in the central and peripheral nervous systems, reduced seizure threshold, deafness and decrease in blood pressure levels.

Figure 1.

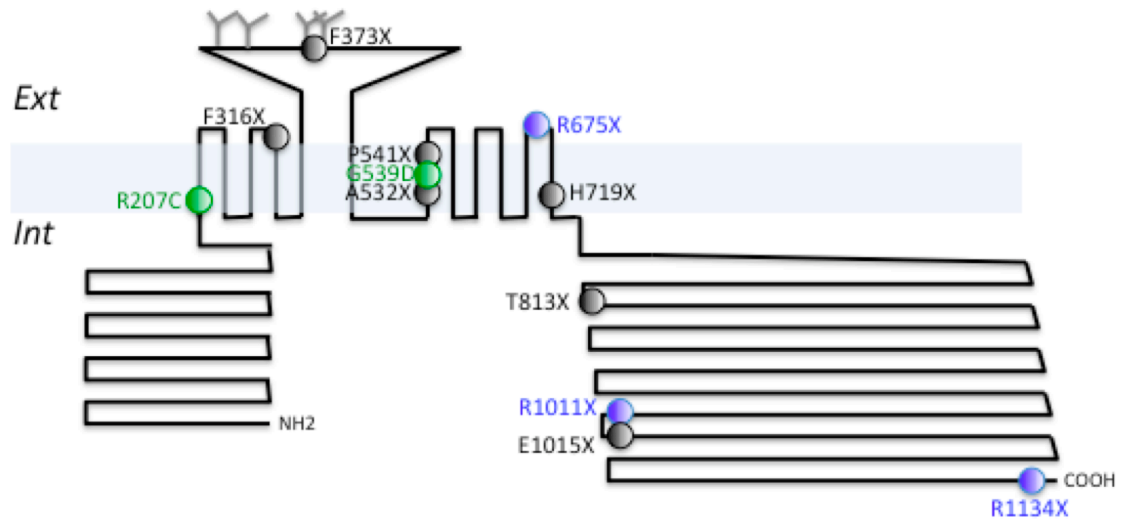


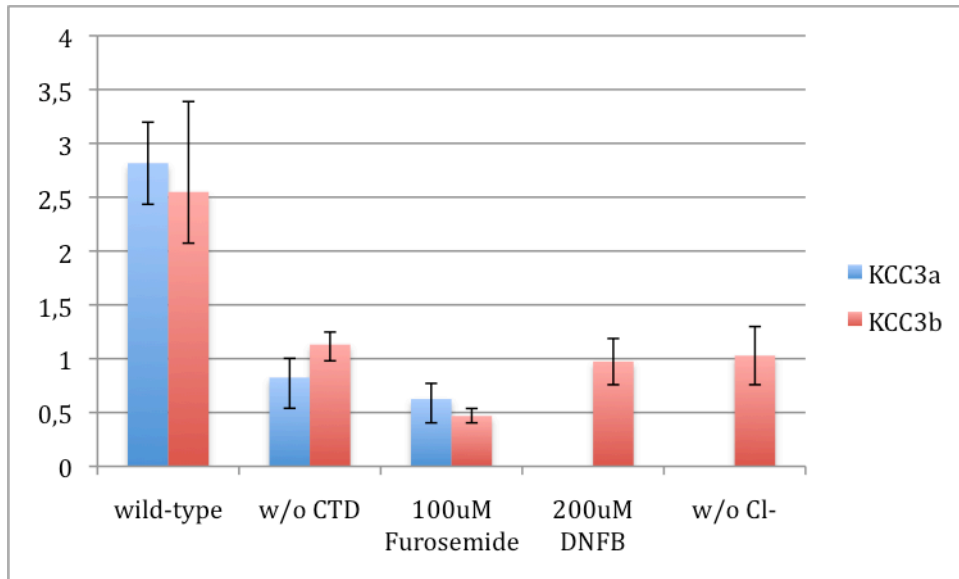
Figure 2.

Figure 3.

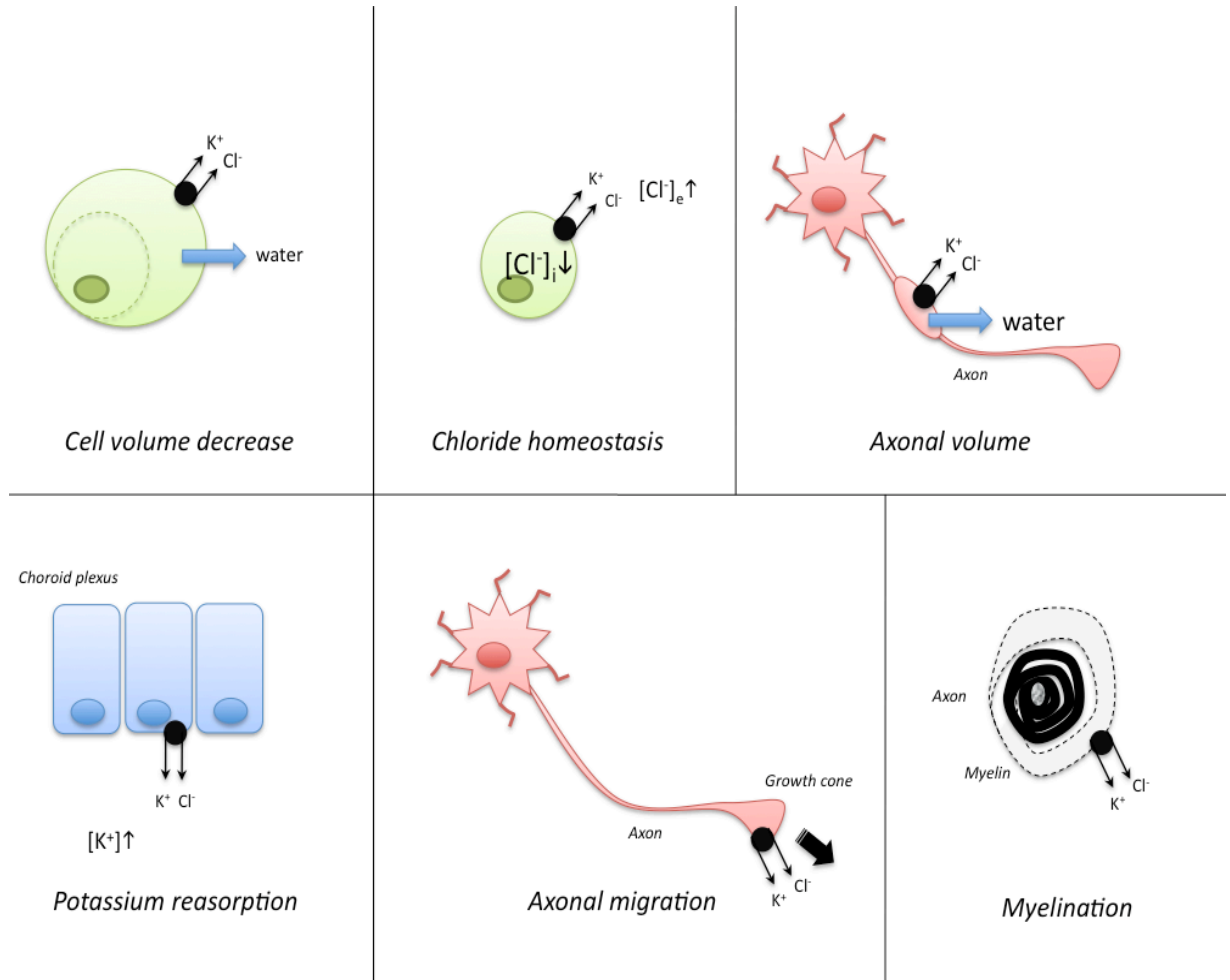
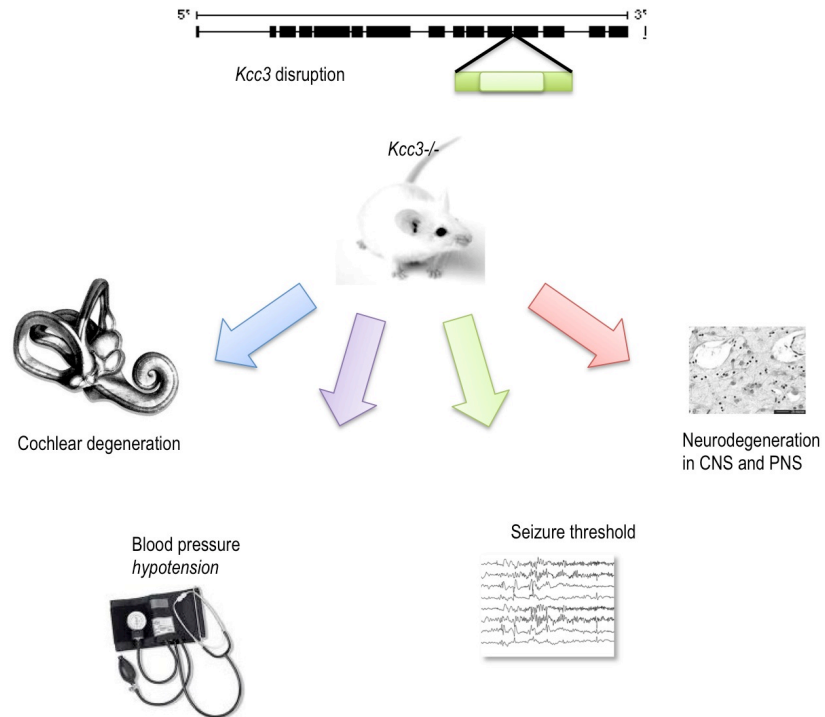


Figure 4.



Résultats complémentaires

Identification d'autres protéines pouvant interagir avec le domaine C-terminal de KCC3

Afin de mieux comprendre en quoi le domaine C-terminal est si important pour l'activité de co-transport de KCC3, j'avais aussi entrepris d'identifier les protéines qui interagiraient avec KCC3 via son C-terminus. Cet objectif a été en partie atteint par l'identification de CK-B comme un partenaire fonctionnel de KCC3 (voir l'*Article 2*). Cependant, nous avons cherché en parallèle à identifier un maximum de partenaires protéiques interagissant directement avec le C-terminus de KCC3. Puis nous nous sommes intéressés en particulier à ceux qui pourraient avoir une influence sur la fonction du co-transporteur et/ou qui permettraient d'expliquer certains aspects mal compris de la maladie (tels que les variations cliniques d'un patient à l'autre). Pour réaliser cet objectif, nous avons utilisé différentes approches protéomiques. Celles-ci nous ont fourni un grand nombre de partenaires-candidats mais il nous reste encore à parvenir à une caractérisation structurale et fonctionnelle de ces interactions putatives.

Ce chapitre englobe les résultats obtenus pour l'ensemble des approches complémentaires d'identification de partenaires protéiques que j'ai utilisée au cours de ce projet. Certains partenaires identifiés dans ce chapitre sont actuellement à l'étude dans le laboratoire.

Introduction

La protéine KCC3 est un co-transporteur d'ions potassium et chlore qui est structurellement composé de douze domaines transmembranaires, d'un domaine N-terminal qui est très variables (sept isoformes) et d'un domaine C-terminal qui hautement conservé entre espèces (voir **Figure 4** du chapitre d'*Introduction*). Il a été parfaitement établi que le C-terminus ne participe pas à la fixation du potassium et du chlore et de ce fait ne joue pas directement sur l'affinité aux ions. Cependant, la perte de fonction de KCC3 dans la NSMH/ACC est directement liée à la perte de segments C-terminaux (Howard et al. 2002). Face à cette évidence d'une importance fonctionnelle du C-terminus, nous avons émis l'hypothèse que cette région très conservée du co-transporteur permettrait des interactions avec des partenaires protéiques fonctionnels (voir **Figure 1** de l'*Article 2*).

De nombreuses méthodes existent pour parvenir à l'identification de partenaires d'interaction dans des complexes protéiques. Au cours de ce projet, nous avons utilisé différentes approches avec plus ou moins de succès. Une première approche d'identification par partenaire candidat a consisté à relever, dans la littérature, des partenaires putatifs de KCC3 par homologie de séquence avec les autres co-transporteurs de cation-chlore. Cette approche a permis de déterminer que CK-B, qui était alors un partenaire connu de KCC2, est également capable d'interagir directement avec KCC3 (*Article 2*). Cependant, nous avons aussi eu recours à des approches plus globales d'identification de partenaires protéiques:

La méthode utilisée ici est une approche originale qui a consisté à identifier des partenaires de KCC3 qui interagiraient avec une petite séquence C-terminale riche en proline. Il s'agit d'un motif prédit *in silico* pour interagir avec des domaines de type SH3. Les domaines SH3 (Src Homology 3) sont de petits modules protéiques d'environ 50–60 résidus d'acides aminés qui sont retrouvés dans des protéines impliquées dans des

processus biologiques variés, tels que les voies de transduction du signal, l'organisation du cytosquelette, le trafic membranaire ou l'assemblage des organelles (Morton et Campbell 1994). Les domaines SH3 se fixent de préférence à des peptides riches en prolines de séquence consensus X-P-p-X-P qui forment des hélices gauches de polyprolines. On distingue des peptides qui ont une orientation de type I et qui contiennent la séquence consensus R/KXXPXXP, alors que ceux d'une orientation de type II ont une séquence consensus de PXXPXR/K. Pour déterminer si cette séquence riche en proline de KCC3 étaient capables d'interagir avec des partenaires à domaines SH3, nous avons eu recours à des 'SH3 Domain array' commerciales où sont spottés des domaines SH3 connues de nombreuses protéines.

Nous avons aussi utilisé d'autres approches dont nous discutons brièvement ici. Une approche classique par double hybride chez la levure avec le domaine C-terminal de KCC3 comme appât pour capter un panel de proies exprimées à partir d'une banque de cDNA de cerveaux de souris adultes. Et, une autre méthode qui s'appuie sur la purification de complexes protéiques par GST pull-down en fusionnant le domaine C-terminal de KCC3 à la GST pour isoler et séquencer des partenaires protéiques exprimés dans le cerveau de souris.

Matériel et méthodes

Membrane SH3 (SH3 domain array)

L'identification des interactions entre le motif PR et les domaine SH3 a été réalisé en utilisant des 15mères peptidiques biotinylés contenant la séquence PR de KCC3 et des membranes SH3 commerciales (panomics) en suivant rigoureusement le protocole du manufacturier. Brièvement, 15µl de peptide biotinilé en solution (1,5µg de peptide au total) est couplé avec de la streptavidine HRP pendant 30min à 4°C. Le mélange est ensuite placé dans une solution de blocage puis incubé pendant 1h avec la membrane SH3. La membrane est lavée 3 fois dans une solution de lavage pour éliminer les interactions non spécifiques et enfin les interactions spécifiques sont révéllées au ECL juste avant que la membrane soit exposée à un film photoréactif pour visualiser les interactions.

GST pull-down

Des cellules HeLa (qui expriment fortement un Vav2 endogène) ou des cerveaux de souris adultes sont lysés dans du tampon RIPA, le lysat est ensuite nettoyé à l'aide de billes nues d'agarose-Glutathione afin d'éliminer les interactions aspécifiques qui se font avec les billes. Des bactéries BL21 sont induites en parallèle à exprimer le domaine C-terminal de KCC3 fusionné à la GST par 500µM IPTG, elles sont ensuite lysées dans du PBS-triton 1%, soniquées et l'extrait protéique recueilli est centrifugé à haute vitesse à 4°C pour éliminer les débris bactériens. 10µg de protéines GST totales sont ensuite immobilisées sur des billes d'agarose-Glutathion incubés avec le lysat pré-nettoyé de cellule HeLa ou de cerveau de souris pendant toute la nuit à 4°C en rotation douce. Les interactions non spécifiques sont ensuite élimées par au moins 3 lavages successifs au tampon RIPA. Les billes sont afin ressuspendues dans du tampon de loading et chargées sur un gel protéique dénaturant SDS-PAGE.

Co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation de KCC3 et Vav2 a été réalisée en utilisant le système 'Dyna Invitrogen beads separation' en suivant rigoureusement les recommandations du fabricant. Brièvement, les constructions dans les vecteurs pcDNA qui permettent l'expression de KCC3 dans les cellules de mammifères ont été transfectées dans des cellules HeLa qui expriment fortement de façon endogène Vav2. Au bout de 48h, les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA et le lysat a été transféré sur les billes magnétiques couplées aux anticorps pour KCC3 ou Vav2. Après trois séries de lavages successifs, les complexes retenus ont pu être dissociés dans du tampon de loading, chargés sur un gel dénaturant et détectés par western-blot à l'aide d'anticorps spécifiques.

Choc hypotonique

Les cellules HeLa ont été maintenues en culture dans du milieu DMEM complété par 10% FBS et d'antibiotiques (Gibco). Les conditions standards ou contrôles ont été établies dans une solution extracellulaire isotonique (~300 mOsm) qui contient (en mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 KH₂PO₄, 10 glucose, and 10 HEPES (pH 7.4). Le gonflement cellulaire a été réalisé dans une solution hypotonique (~240 mOsm) où le glucose a été omis. Les expériences ont été réalisées dans des conditions de culture cellulaire normales à 5% CO₂ et 37°C en tout temps et les conséquences du choc ont pu être suivies à l'aide d'une station microscopique d'imagerie en live-stage (Leica) sur une durée totale de 15 minutes.

Double hybride

Le système 'Clontech Matchmaker Two Hybrid' a été utilisé. Brièvement, les cDNA codant pour des fragments C-terminaux de KCC3 ont été sous-clonés dans le vecteur pGBKT7 Gal4 DNA-binding domain bait vector et a servi d'appât. Une banque de cDNA de cerveau de souris adulte contenu dans le pGADT7 Gal4 DNA-activating domain prey vector a été utilisée pour détecter des interacteurs potentiels. Des cellules de levure AH109

appât ont été transformée avec le vecteur pGBKT7 puis croisée avec des cellules de levure proie exprimant la librairie de cDNA. Les clones diploïdes on ensuite été sélectionnés sur un milieu minimal sans Leu, Trp ni His pour détecter les interactions. Le cDNA contenus dans les clones résistants ont enfin été séquencés pour identifier les partenaires putatifs. Aucune interaction n'a été obtenue lorsque le seul domaine Gal4 est exprimé dans les levures.

Résultats

Identification d'un motif riche en proline *in silico*

Pour identifier des portions de KCC3 qui participent à des interactions fonctionnelles, nous avons fait appel à des algorithmes capables d'identifier des motifs peptidiques qui ont des configurations consensus pour des domaines protéiques bien spécifiques. À l'aide du webware ELM ou « eukaryotic linear resource for functional sites in proteins » (<http://elm.eu.org/>), nous avons filtré les motifs du C-terminus qui ont un intérêt pour un KCC3 du taxon humain et qui serait localisé à la membrane plasmique. La liste des motifs identifiés par cette méthode est présentée dans le **Tableau VI**. Parmi les séquences les plus C-terminales se trouve une région enrichie en proline qui est prédite *in silico* par ELM comme un site de fixation à des protéines à domaine SH3. Il s'agit du motif riche en proline **PXPPXP** (référé par PR) qui est un site de type I non-canonique.

Tableau VI.

Liste des motifs contenus dans le C-terminus de KCC3 et reconnus *in silico* par le webware ELM.

Nom	Motif	Positions	Description fonctionnelle	Compartiment cellulaire	Pattern
Ligand PDZ	GDGI	26-29	Motif de fixation de domaine PDZ de classe III	Cytosol, membrane plasmique, membrane	.[DE].[IVL]
	DEDL	65-68			
	GEAL	104-107			
	AEKV	119-122			
	REGI	135-138			
	VEVV	272-275			
	QEKV	341-344			
	QDLL	368-371			
	NEVI	390-393			
	MEFL	421-424			
	LEVL	424-427			

	TEGL	428-431			
	LERV	431-434			
	SEVI	442-445			
Ligand SH3	<u>DLHV</u> KHP	67-73	Motif reconnu	Cytosol,	...[PV]..P
	LNMP <u>GPP</u>	405-411	par des	membrane	
	<u>PGPP</u> RNP	408-414	domaines SH3	plasmique,	
			avec une	adhésion focale	
			spécificité de		
			reconnaissance		
			non-canonique		
			de classe I		
Signal de	<u>Y</u> AIV	1-4	Signal à base de	Cytosol,	Y..[LMVIF]
« sorting » à	<u>Y</u> KYI	13-16	Tyrosine	membrane	
Tyrosine	<u>Y</u> MEF	420-423	responsable de	plasmique,	
			l'interaction	vésicules	
			avec la sous-	recouvertes de	
			unité mu du	clathrin	
			complexe AP		
			(Adaptor		
			Protein)		

Note : Les résultats présentés ici correspondent aux motifs identifiés après le filtrage de domaines globulaires, le filtrage structural et le filtrage contextuel (membrane plasmique). Les sites qui se trouvent dans des domaines globulaires (structures cachées) ont été exclus de cette liste, sauf si ils fournissaient un score structurel acceptable.

Nous avons poursuivi les études *in silico* en nous intéressant au niveau de conservation inter-espèces du motif PR. En effet, on considère que plus un motif est conservé d'une espèce à l'autre, plus son importance pour la fonction de la protéine est élevée. Nous avons comparé les séquences peptidiques du domaine C-terminal de KCC3 ou Kcc qui lui sont apparentés chez différents taxons par alignement de séquences protéiques. Nous avons ainsi constaté que dans la séquence consensus PGPPRNP, les prolines en position 1, 3 et 4 ont 100% de conservation de l'homme à la plante, ce qui suggère fortement une importance fonctionnelle de ces résidus (**Figure 6**).

Figure 6.
Conservation du motif PR entre espèces

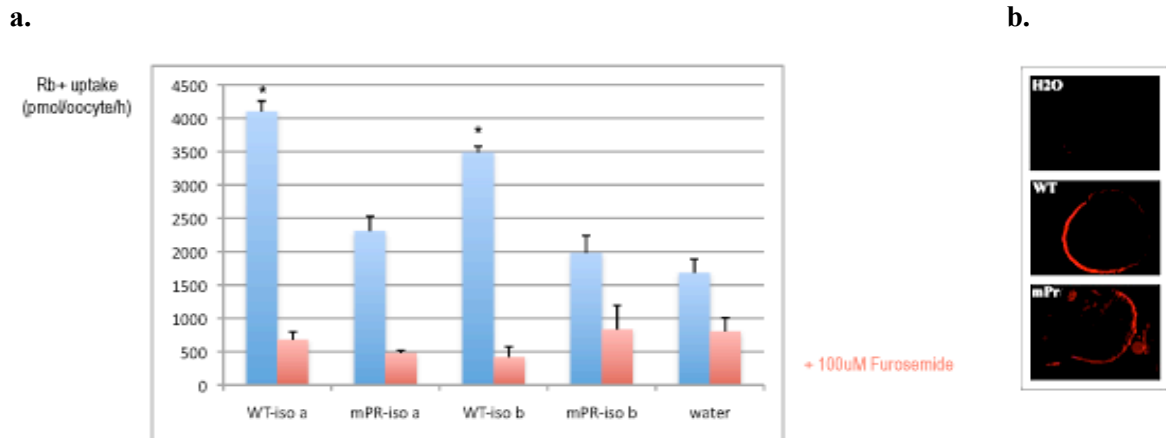


Comparaison des séquences peptidiques flanquantes de PR dans le domaine C-terminal de KCC3 humain et des Kcc homologues qui ont été retrouvées dans différents taxons (*macaca mulatta*, *mus musculus*, *ornithorhynchus anatinus*, *ovis aries*, *ciona intestinalis*, *caenorhabditis elegans*, *xenopus laevis*, *arabidopsis thaliana* et *danio rerio*) par alignement de séquences protéiques. Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel CLC protein workbench (*CLCbio*). Noter que dans la séquence PXPXP, les prolines en position 1, 3 et 4 sont conservées à 100% de l'homme à la plante.

Le motif PR est important pour la fonction de KCC3

Afin de déterminer si PR est réellement important pour la fonction de KCC3, nous avons testé la fonction d'un KCC3 mutée pour ce motif (PGPP→PGQA) à l'aide d'études de flux dans les ovocytes de Xénope. La forme sauvage induit un flux d'ions qui est significativement différent de la mesure obtenue avec des ovocytes injectés avec de l'eau ($P < 0.001$ ANOVA). Par contre, le flux de $^{86}\text{Rb}^+$ est sérieusement diminué lorsque le motif PR était muté, au point d'être non significatif. Ceci suggère fortement que PR est important pour l'activité normale de KCC3 (**Figure 7**).

Figure 7.
Importance du motif PR pour la fonction de KCC3

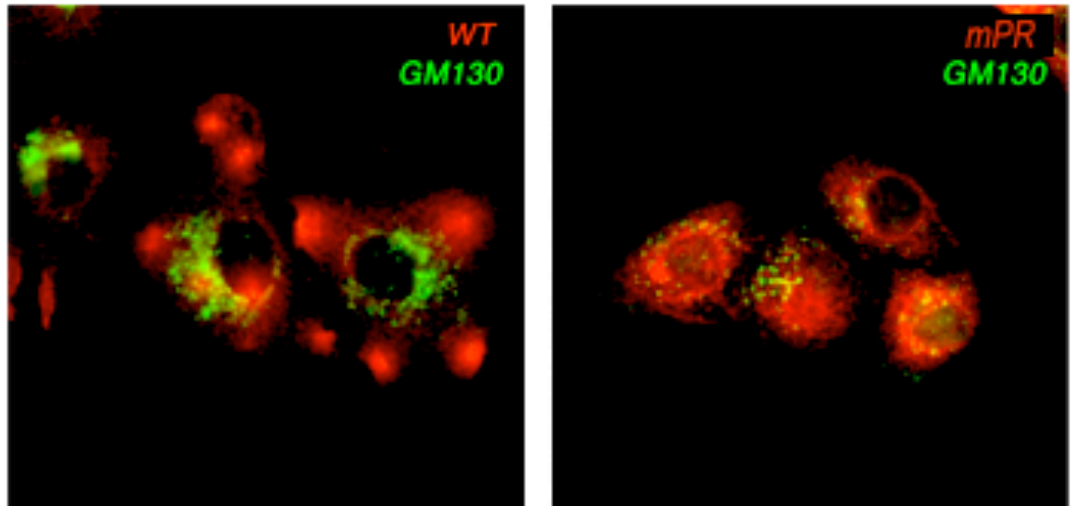


a. Le motif PR est important pour la fonction de KCC3. L'activité des différentes formes a été mesurée en suivant le flux d'un isotope radioactif ($^{86}\text{Rb}^+$) qui est transporté par KCC3. Cette activité est abolie en présence de l'inhibiteur furosémide ce qui confirme la spécificité du flux. **b.** La mutagenèse du motif PR n'affecte pas la localisation de KCC3 à la membrane plasmique des ovocytes de Xénope. L'adressage correct des KCC3 à la membrane plasmique a été confirmé par marquage immunofluorescent sur des coupes d'ovocytes à l'aide d'un anticorps spécifique pour KCC3 (Abnova).

Pour comprendre comment le motif PR affecte la fonction de KCC3, nous avons fait s'exprimer de façon transitoire les formes sauvage et mutée mPR dans des cellules de mammifères (HeLa) par transfection transitoire. Sur Western-blot, il semble que la forme PGQA soit moins abondante, la forme mutée serait donc moins bien exprimée ou moins stable que la forme sauvage lorsqu'elle est exprimée dans les cellules de mammifères. À l'aide du marquage immuno-fluorescent de KCC3, nous avons constaté la localisation intense de la forme sauvage à la membrane plasmique, en particulier au niveau des extensions cellulaires (probables lamellipodes). Par contre, la forme mutée pour le motif PR présente une distribution aberrante qui est plus diffuse à travers la cellule et qu'il nous reste encore à mieux caractériser (**Figure 8**).

Figure 8.

La mutagenèse du motif PR affecte la localisation de KCC3 aux extensions cellulaires.



La même mutagenèse de PR (voir **Figure 6**), mais cette fois-ci celle-ci a été effectuée dans l'ADNc de KCC3 qui est inséré dans un vecteur pcDNA 3.1 (*invitrogen*) (celui-ci permet l'expression de KCC3 dans les cellules de mammifères). La localisation de KCC3 a été évaluée à l'aide d'un anticorps spécifique (rouge). L'appareil de Golgi a également été marqué (vert).

Le motif PR est un site de fixation de domaine SH3 'in vitro'

Le motif PR a été identifié *in silico* comme un site de fixation de protéine à domaine SH3. Afin de confirmer l'existence de ce type d'interaction, nous avons utilisé des membranes SH3 disponibles commercialement (*Panomics*) sur lesquelles une collection de domaines SH3 connus est dot-blottée en *duplicata*. En parallèle, nous avons fait synthétiser des 15mères polypeptidiques biotinilés contenant le motif PR (LLNMPGPPRNPEGDE) pour les incuber avec nos membranes en suivant les recommandations du manufacturier. Nous avons ainsi confirmé que ce motif PR était effectivement capable d'interagir avec des domaines SH3 et nous avons obtenu un profil d'interaction du motif PR (**Figure 9**).

Figure 9.

Profil d'interaction entre le 15mère de KCC3 contenant le motif poly-proline et des domaines SH3 connus (SH3-array I).

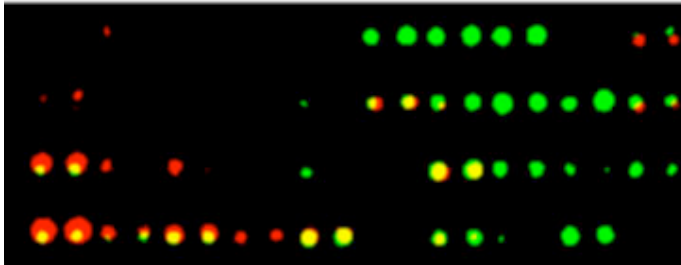
WT : LLNMPGPPRNPEGDE

mPR : LLNMPGQARNPEGDE

a.



b.



a. Profil inversé obtenu après incubation avec le 15mère sauvage (peptide wt). Les domaines SH3 qui ont été spottés en *duplicata* sur la membrane. **b.** Profil comparatif des interactions obtenues selon que le motif PR soit sauvage ou muté. Le profil en vert correspond aux interactions obtenues avec le 15mère sauvage (peptide WT). Le profil en rouge correspond au profil obtenu avec le 15mère muté pour le motif PR (peptide mPR). L'attribution des couleurs a été faite artificiellement à l'aide d'un logiciel d'édition d'images (Photoshop). La superposition des deux couleurs donne du jaune. L'expérience a été effectuée en suivant le protocole d'utilisation du manufacturier (*Panomics*). Les membranes ré-hydratées et bloquées ont été incubées avec les peptides biotinylés en solution (10ng/ml) pendant la nuit à 4°C. Après incubation, les interactions ont été visualisées par de la streptavidine-HRP suivie de la révélation des membranes.

Nous avons une liste assez conséquente d'interacteurs potentiels. Afin de hiérarchiser ces partenaires candidats, nous avons établi différents critères, tels que la force de l'interaction (évaluée arbitrairement par l'intensité du spot), des interactions avec plusieurs protéines de la même famille, l'implication du partenaire putatif dans la

régulation du volume cellulaire, l'identification du partenaire putatif par d'autres méthodes, expression dans le système nerveux et aussi la spécificité de l'interaction (en incubant les membranes avec un peptide muté pour PR (LLNMPGQARNPEGDE)). Dans un but de simplicité, seuls les résultats d'intérêt obtenus avec la SH3-array I ont été expliqués plus en détail (**Tableau VII**).

Tableau VII

Liste des protéines à domaine SH3 capables d'interaction forte avec le peptide KCC3 sauvage pour le motif mPR.

	Spot WT	Protéines apparentées	RVC	Autre méthode	Spot mPR	Système nerveux
Yes1	++	c-Src	-	-	-	oui
Abl2	++	Abl2	-	-	-	oui
Spectrin (eryth)	+++	-	oui	-	-	non
c-Src	+	yes	oui	-	+	oui
FYB-D1	+	FYB-D2	-	-	-	oui
Hck	+++	-	-	-	-	non
Vav2	++	Vav	oui	P-D	-	oui
NOF2-D1	+	-	-	-	+	oui
Vav-D1	+	Vav2	-	-	++	non
PSD-95	+++	-	-	-	+++	oui
Tim	+	-	-	-	-	oui
Stam	+	-	-	-	-	non
BLK	+	-	-	-	++	non
PLCgamma	+	-	oui	-	-	oui
PI3beta	+++	-	oui	-	+++	oui
ITSN-D2	+	-	-	-	+	oui

Spot: intensité du spot détectée avec le peptide sauvage (WT) ou muté (mPR) – les interactions faibles avec le peptide sauvage qui n'étaient visibles qu'en cas de surexposition ne sont pas indiquées ici; +++, ++, +: correspondent à des évaluations d'intensité du spot estimées par la quantification moyenne des pixels (*Photoshop*); Protéines apparentées: autres partenaires identifiés sur d'autres SH3-arrays et qui appartiennent à la même famille de protéines; RVC: implication dans la régulation du volume cellulaire dans la littérature; Autres méthodes: identification de l'interaction avec KCC3 par des approches complémentaires. P-D: pull down; N/D: non disponible

Parmi les partenaires de plus grand intérêt, on a trouvé les Vav et en particulier Vav2. Deux des domaines SH3 de Vav2, mais aussi des domaines SH3 des protéines apparentées Vav et Vav3, interagissent *in vitro* avec le motif PR. Il a de plus été montré que Vav2 jouerait un rôle dans la régulation du volume cellulaire en partenariat avec la protéine Src (Barfod et al. 2005) en plus d'être impliquée dans le développement du système nerveux (Schmid et al. 2004). Il a aussi été montré que la souris invalidée pour *Rac1* (dont Vav2 est GEF importante pour la protéine Rac1) présente de l'agénésie du corps calleux (Kassai et al. 2008, Briancon-Marjollet et al. 2008). Étant donné tous ces indices, nous avons décidé de poursuivre l'étude de l'interaction de KCC3 avec ce candidat. Noter que nous parlons plus brièvement d'autres partenaires à domaine SH3 d'intérêt plus loin dans ce chapitre.

Le domaine C-terminal de KCC3 permet une interaction physique avec Vav2 (qui ne semble pas impliquer spécifiquement PR)

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences de GST pull-down afin de confirmer l'interaction de Vav2 avec KCC3. Le domaine C-terminal de KCC3 a été fusionné à la GST et mis en présence d'un extrait protéique de cellules HeLa, qui expriment Vav2 de façon endogène. Cette expérience nous a montré la capacité du domaine C-terminal d'interagir *in vitro* avec Vav2 (**Figure 10a**). Cependant, la forme de KCC3 mutée pour le motif PR (mPR) semble toujours interagir avec Vav2, ce qui laisserait penser que PR n'est pas indispensable pour cette interaction. Réciproquement, des constructions sauvage ou mutée pour le motif PR de KCC3 ont été transfectées dans des cellules HeLa exprimant abondamment Vav2 de façon endogène. Ainsi, comme les expériences de GST-pull down semblent le suggérer, Vav2 et la forme KCC3 mutée (mPR) semblent co-immunoprécipiter ensemble (**Figure 10b**).

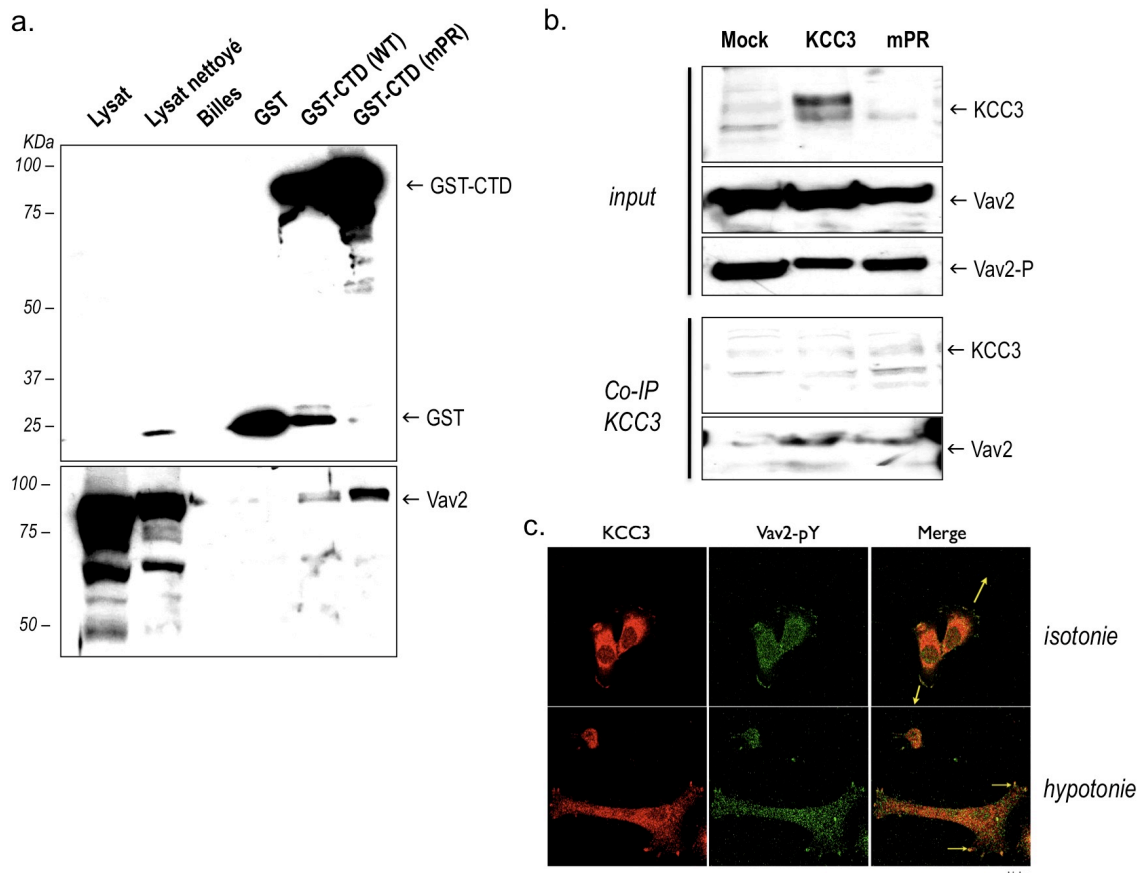
À noter que le co-immuno-marquage de KCC3 et Vav2 phosphorylé montre que les deux protéines co-localisent finement dans les cellules de mammifères, en particulier au

niveau du front de migration de la cellule (**Figure 10c**). Vav2 et KCC3 font donc très probablement partie d'un même complexe protéique.

Nous avons donc une succession d'évidences préliminaires qui suggère que l'interaction que nous observons entre Vav2 et KCC3 existe bel et bien mais n'implique probablement pas le domaine PR *in vivo*.

Figure 10.

Évidences de l'interaction entre KCC3 et la protéine modulatrice du cytosquelette Vav2.



a. Expériences de GST pull-down effectuées avec une protéine chimérique contenant le domaine C-terminal de KCC3 sauvage (WT) ou muté pour le domaine PR (mPR) fusionné à la GST. Ces expériences montrent que le C-terminus de KCC3 interagit avec la protéine Vav2 exprimée de façon endogène dans les cellules HeLa. L'interaction se produit également avec la protéine chimérique mutée pour le domaine PR. b. Co-immunoprécipitation de Vav2 (détecté et précipité par un anticorps spécifique *Abcam*) avec KCC3 (détecté et précipité par un anticorps spécifique commercial *Abnova*) lorsque les deux protéines sont co-exprimées dans les cellules HeLa. L'interaction semble persister même lorsque le domaine PR est muté. c. Co-localisation de KCC3 avec la forme active phosphorylée de Vav2 dans des cellules HeLa au niveau des bordures cellulaires (front de migration) et au niveau des protubérances cytoplasmiques induites par des conditions hypotoniques dans des cellules de mammifères.

Discussion

Pourquoi ces résultats contradictoires avec Vav2 ?

Nos expériences de GST pull-down et de co-immunoprécipitation suggèrent que le motif PR et le domaine SH3 de Vav2 ne sont pas nécessaires pour qu'il se produise une interaction entre KCC3 et Vav2. Ces résultats sont en contradiction avec le fait que c'est le motif PR qui a permis d'identifier Vav2 comme un partenaire potentiel. Ces résultats contradictoires sont à investiguer plus en avant. De ce fait, nous n'excluons pas la possibilité que Vav2 soit capable d'interagir avec KCC3 *in vitro* via plusieurs régions du C-terminus. Selon ce schéma, Vav2 pourrait interagir à la fois de manière directe avec le motif PR mais de manière directe ou indirecte avec une ou plusieurs autres séquences inconnues. La dichotomie des régions d'interaction entre KCC3 avec Vav2 par délétion de fragments successifs du C-terminus de KCC3 devrait permettre de répondre à cette question.

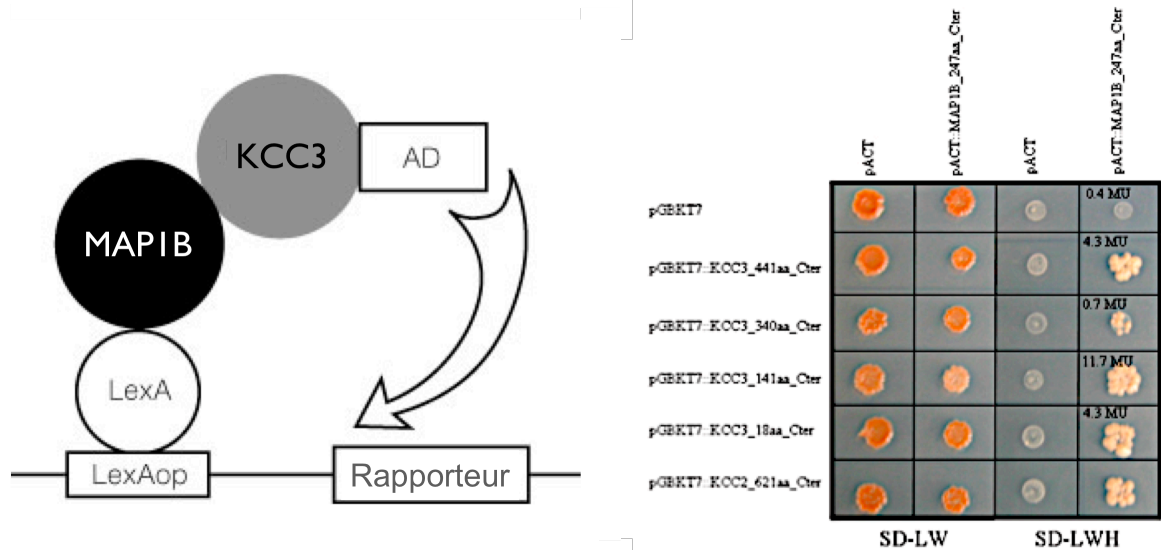
Au cours de cette étude, nous avons identifié d'autres partenaires d'intérêt, tels que MAP1B, la vinexine et la spectrine et dont nous discutons brièvement dans cette section.

Identification de MAP1B comme partenaire putatif de KCC3

La microtubule-associated protein 1B (MAP1B) est le seul partenaire que nous ayons identifié par l'approche globale double hybride (**Figure 11**).

Figure 11.

La microtubule-associated protein 1B (MAP1B) interagit avec le C-terminus de KCC3.



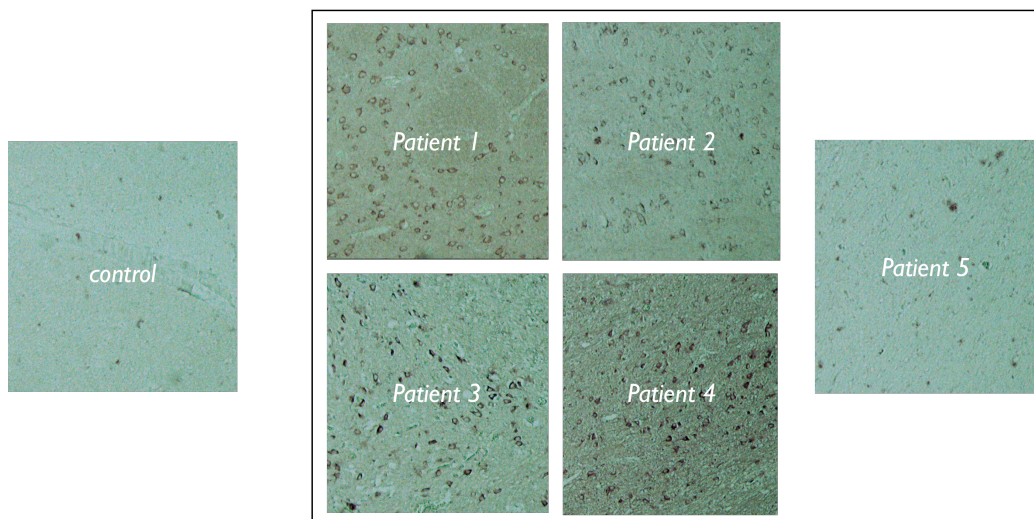
(à gauche) représentation schématique du système double hybride utilisé pour cette expérience. (à droite) MAP1B interagit avec les 18 derniers a.a. de KCC3 dans le système double hybride. Des fragments du domaine C-terminal ont été clonés dans pGBKT7 en tant que proie dans un criblage double hybride sur une banque de cDNA de cerveau de souris. Deux types de clones positifs ont été identifiés : le premier est un activateur connu du système (non indiqué) et le second correspond à la chaîne lourde de MAP1B (HC).

MAP1B est la principale protéine associée aux microtubules dans le cerveau en développement. Chez le cerveau de rat nouveau né, c'est le composant majoritaire des microtubules puis son niveau chez l'adulte devient 10 fois inférieur. Ce changement de niveau d'expression se produit en même temps que la maturation neuronale. MAP1B est aussi la première MAP à apparaître dans l'axone en croissance durant le développement neuronal où il est présent dans la première émergence de l'axone qui naît du corps cellulaire. MAP1B a aussi été impliquée dans la pathogenèse de l'axonopathie géante (GAN), une neuropathie très ressemblante à la NSMH/ACC (*paragraphe 2* du chapitre d'*Introduction*). En effet, il a été montré que la chaîne légère de MAP1B interagit avec la gigaxonine, ce qui permet la dégradation de la MAP (Allen et al. 2005). Et de même que dans la GAN, l'immuno-marquage de MAP1B sur des échantillons de cerveaux de patients

NSMH/ACC suggère qu'il y a souvent une accumulation anormale de la protéine MAP1B chez les individus malades (**Figure 12**). Enfin, l'inactivation de MAP1B chez la souris mène à l'agénésie totale ou partielle du corps calleux (Meixner et al 2000, Bouquet et al. 2004). L'ensemble de ces données suggère que MAP1B est un excellent candidat qui, si il se confirme, permettra d'expliquer bien des aspects de la pathogénèse de la NSMH/ACC.

Figure 12.

Immuno-marquage de MAP1B dans le cerveau de patients NSMH/ACC (Pons).



MAP1B est ré-exprimé dans des cellules du SNC chez les patients NSMH/ACC. Le signal pour MAP1B est absent chez les individus non atteints, alors qu'il existe des foyers de cellules fortement positives pour MAP1B dans le pons de quatre patients NSMH/ACC sur les cinq qui ont été testés. L'immunoréaction observée ici a été réalisée avec l'anticorps dirigé contre la chaîne lourde de MAP1B (*Abcam*) sur des tissus parafinés de patients en suivant un protocole similaire à celui retrouvé dans la section *Material and methods* de l'*Article 4*.

Malheureusement, la protéine MAP1B est toxique lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules de mammifères ce qui rend délicates nos investigations complémentaires. Pour palier à ce problème, nous disposons désormais d'une construction inductible (Tet-on) qui aidera à outrepasser cette toxicité et avec laquelle nous continuerons de chercher des évidences d'interaction fonctionnelle entre KCC3 et MAP1B (*e.g.* co-immunoprécipitation, co-immunomarquage, etc.).

Identification de la Vinexine comme partenaire putatif de KCC3

Un autre partenaire identifié est la Vinexine. Nous avons d'abord identifié la Vinexine par une approche globale de GST pull-down utilisant le domaine C-terminal fusionné à la GST et des extraits totaux de protéine du cerveau de souris adulte. L'ensemble des partenaires identifiés par cette méthode est listé dans le **Tableau IX** en données supplémentaires de ce chapitre. La Vinexine est une protéine qui est constituée d'un domaine SoHo et de trois domaines SH3. Il a été montré qu'elle pouvait jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire, l'étalement cellulaire et la migration, ainsi que dans l'organisation du cytosquelette (Mizutani et al. 2004, Umemoto et al. 2009). Elle s'associe entre autres à la vinculine, un interacteur de la Paxiline au niveau des zones de contact cellule-cellule (kioka et al. 1999). Comme nous avons en plus des évidences complémentaires qui suggèrent que des domaines SH3 de la Vinexine interagiraient avec le motif PR, nous pensons éventuellement porter une attention particulière à cette protéine à l'avenir (**Figure 13** en *Données supplémentaires* de ce chapitre).

Identification de la spectrine comme partenaire putatif de KCC3

Parmi les autres candidats les plus prometteurs identifiés par la méthode à membrane SH3, on trouve la spectrine (voir **Figure 9** et **Tableau VII**). Cependant, cette interaction semble être spécifique pour la spectrine alpha érythrocytaire (pas de spot intense avec la spectrine alpha non-érythrocytaire), ce qui exclut un lien entre cette interaction potentielle et des anomalies du système nerveux. Ce type de spectrine est le composant prédominant du cytosquelette membranaire des globules rouges et est essentielle dans la détermination de la forme et de la déformabilité de la membrane (Orlov et al. 1993). Cependant, l'importance de KCC3 dans la régulation du volume cellulaire des globules rouges rend cette interaction particulièrement intéressante (Sachs et al. 1999). Il a aussi été montré que la dénaturation spécifique de la spectrine à 45°C affectait la RVC, ce qui suggère un lien fonctionnel des acteurs de la RVC (KCC3 inclus) et la spectrine (Orlov et al. 1993). De plus, nous avons constaté des interactions avec différents éléments du

cytosquelette de spectrine (spectrine, ankyrine, actine, etc.) par GST pull-down réalisé avec le C-terminus de KCC3 fusionné à la GST (**Tableau IX** en *Données supplémentaires*).

Identification de protéines chaperones comme partenaires putatifs de KCC3

D'autres excellents candidats sont les chaperonines. Leur fonction est d'assister d'autres protéines dans leur maturation, en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat et un adressage correct. Beaucoup de chaperonnes sont des protéines de choc thermique (heat shock proteins: Hsp) qui sont exprimées en réponse à des variations de température ou à la suite d'autres types de stress cellulaires. Lors du GST pull-down qui a été réalisé avec le domaine C-terminal de KCC3 et un extrait protéique de cerveau de souris adulte, un certain nombre de protéines chaperones complexé que le C-terminus ont été isolées et séquencées (voir **Tableau IX** en *Données supplémentaires*). Parmi ces chaperonines séquencées on trouve la hsp60, qui, chez l'homme, est mutée dans deux neuropathies : la paraplégie spastique familiale autosomique dominante (SPG13) (Hansen et al. 2002) et une leukodystrophie hypomyelinisante autosomique récessive (Magen et al. 2008). Étant donnée l'instabilité que nous observons pour certaines KCC3 tronquées et les localisations aberrantes des co-transporteurs mutés, il n'est pas impossible que de telles interactions soient bien réelles et modulent le repliement normal et l'adressage de KCC3 à la surface de la cellule.

Tableau VIII.

Liste des meilleurs partenaires candidats identifiés et les approches utilisées.

Partenaire	Méthode d'identification initiale	Méthodes d'identification complémentaires
Vav2	SH3-domain array	GST pull-down Co-immunoprécipitation Co-localisation
MAP1-B	Double hybride chez la levure	Interaction avec la tubuline bêta par GST pull-down/séquençage
Vinexine	GST-pull down/séquençage	SH3-domain array

Spectrine	GST-pull down/séquençage	SH3-domain array Dénaturation spécifique à 45°C affecte la RVC
Hsp60	GST pull-down	-

Note : Les partenaires de KCC3 les plus prometteurs sont tous impliqués dans la dynamique ou la structure du cytosquelette.

Données supplémentaires

Tableau IX

Candidats obtenus par séquençage LC-MSMS après GST pull-down

Reference	P (pro)	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide
Scan(s)	P (pep)	XC	DeltaCn	Sp	RSp	(Hits) Ions
1 CH60_SERMA 60 kDa chaperonin Cpn60) (groEL protein) 2282	333E-17	10,36		56638,8	6225138	3 (3 0 0 0 0)
	K.AGKPLLIIAEDVEGEALATLVVNT MR.G	520E-15	7,14	0,55	2810,7	1 29/50
2288	K.AGKPLLIIAEDVEGEALATLVVNT MR.G	333E-17	6,70	0,49	2957,1	1 29/50
2399	K.AGKPLLIIAEDVEGEALATLVVNT MR.G	707E-10	5,60	0,54	1450,1	1 24/50
2 A25113 tubulin beta chain 15 - rat 1739	142E-13	76,28		49905,0	92930	16 (12 4 0 0 0) 0)
	R.SGPFQGIQFRPDNFVFGQSGAGNN WAK.G	142E-13	5,52	0,40	1437,0	1 31/100
1736	R.SGPFQGIQFRPDNFVFGQSGAGNN WAK.G	670E-10	5,50	0,37	1405,5	1 35/100
1751	K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K	505E-06	5,49	0,54	2573,3	1 26/34
1758	K.MSATFIGNSTAIQELFK.R	474E-10	4,72	0,45	1320,5	1 22/32
1116	K.EVDEQMLNVQNK.N	698E-05	4,45	0,27	1453,0	1 18/22
1521	R.AILVDLEPGTMDSVR.S	348E-13	4,18	0,08	1128,8	1 23/28
1527	R.AILVDLEPGTMDSVR.S	226E-05	4,08	0,16	723,8	1 20/28
1752	R.SGPFQGIQFRPDNFVFGQSGAGNN WAK.G	738E-09	3,95	0,46	680,3	1 20/50
1748	K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K	118E-07	3,84	0,22	1753,7	1 23/34
1412	R.ISEQFTAMFR.R	232E-07	3,75	0,48	1741,1	1 16/18
1104	K.EVDEQMLNVQNK.N	478E-07	3,69	0,37	1579,0	1 18/22
2007	K.LTTPYIGDLNHLVSATMSGVTTT LR.F	548E-07	3,62	0,39	484,8	1 24/96
987	R.INVYYNEAAGNK.Y	273E-03	3,14	0,21	953,0	1 16/22
1004	R.INVYYNEAAGNK.Y	877E-06	2,82	0,14	937,5	1 16/22
1754	K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K	424E-04	2,41	0,20	744,3	2 22/68
1757	K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K	382E-03	2,17	0,09	477,0	3 19/68
4 TBB4_MOUSE Tubulin beta-4 chain 1230 - 1232	223E-12	30,23		49520,0	4639774	4 (4 0 0 0 0) 9
	R.INVYYNEATGGNYVPR.A	283E-11	4,63	0,53	1106,0	1 21/30
1689 - 1691	R.ALTVPELTQQMFDK.N	223E-12	3,66	0,42	662,9	1 20/28
1242	R.IMNTFSVVPSPK.V	191E-06	3,22	0,49	1203,0	1 17/22
1247	R.IMNTFSVVPSPK.V	756E-05	2,99	0,43	897,6	1 15/22
6 GSTM6_MOUSE Glutathione S-transferase Mu 6 (GST class-mu 6) (Glutathione-S-tr 1827	380E-12	20,21		25588,9	5133873	6 (5 1 0 0 0) 9
	K.LGLDFPNLPYLIDGSHK.V	380E-12	4,28	0,50	925,4	1 20/32

1833	K.LGLDFPNLPYLIDGSHK.V	280E-11	4,25	0,52	1167,2	1	22/32
1832	K.LGLDFPNLPYLIDGSHK.V	141E-09	3,60	0,38	1159,3	1	29/64
1944	K.LGLDFPNLPYLIDGSHK.V	568E-08	2,83	0,38	864,2	1	26/64
1191	K.LYSEFLGK.Q	997E-03	2,21	0,17	621,8	1	10/14
1197	K.LYSEFLGK.Q	278E-04	2,09	0,00	767,1	1	11/14
7	Carbonyl reductase 1 [Mus musculus]	650E-12	10,23		30622,0	1521524	1 (1 0 0 0 0)
1842	K.EYGGDLVNVNAGIAFK.V	650E-12	4,59	0,47	1745,4	2	24/32
8	glutathione S-transferase, mu 5 [Mus musculus]	354E-11	80,22		26617,3	6754086	16 (16 0 0 0 0)
1601	R.VDIMENQIMDFR.M	158E-08	4,39	0,41	1848,3	1	18/22
1604	R.VDIMENQIMDFR.M	354E-11	4,31	0,34	1839,4	1	19/22
2403	K.LTFVDFLTVDVLDQNR.I	224E-09	4,31	0,41	1066,3	1	24/60
1965 - 1967	K.FKLDLDFPNLPYLMGDK.N	143E-06	4,20	0,34	1325,1	1	33/64
1962 - 1964	K.FKLDLDFPNLPYLMGDK.N	177E-09	4,19	0,56	1223,7	1	21/32
2004 - 2006	K.LDLDFPNLPYLMGDK.N	147E-05	4,19	0,50	751,0	1	19/28
2340	K.LTFVDFLTVDVLDQNR.I	200E-08	3,82	0,49	1330,8	1	19/30
1071	K.IAAFLQSDR.F	181E-06	3,29	0,28	1235,7	1	14/16
1068	K.IAAFLQSDR.F	160E-07	3,20	0,36	1455,7	1	15/16
1605	K.SMVLYGWDIR.G	473E-06	3,05	0,34	1160,1	1	15/18
1614	K.SMVLYGWDIR.G	390E-07	3,03	0,47	1119,1	1	15/18
1293	K.FTWFAGEK.L	103E-03	2,89	0,31	360,5	2	10/14
2334	K.LTFVDFLTVDVLDQNR.I	824E-04	2,84	0,24	802,3	1	15/30
2394	K.LTFVDFLTVDVLDQNR.I	770E-06	2,49	0,33	591,7	2	21/60
1083 - 1085	R.SQWLDVK.F	532E-04	2,19	0,05	403,0	2	10/12
1296	K.FTWFAGEK.L	202E-06	2,13	0,25	371,0	4	10/14
9	CH60_SERRU 60 kDa chaperonin (Protein Cpn60) (groEL protein)	407E-11	70,26		56604,7	6225139	13 (13 0 0 0 0)
1307	R.AAVEEGVVAGGGVALIR.V	125E-07	5,21	0,37	1889,9	1	22/32
1082	K.AIAQVGTISANSDETGVK.L	407E-11	4,72	0,58	934,0	1	21/34
1079	K.AIAQVGTISANSDETGVK.L	629E-09	4,49	0,56	1146,9	1	23/34
1304	R.AAVEEGVVAGGGVALIR.V	132E-10	4,43	0,44	2102,3	1	24/32
1155 - 1157	K.AVAAGMNPMDLK.R	168E-06	3,93	0,41	1367,9	1	18/22
1316	R.AAVEEGVVAGGGVALIR.V	206E-05	3,17	0,36	554,7	1	18/32
2388 - 2390	R.SALQYAASVAGLMITTECMVTDL PK.E	713E-03	2,96	0,44	525,9	1	19/48
1319	R.AAVEEGVVAGGGVALIR.V	115E-04	2,70	0,38	486,1	1	18/32
951	K.ATLEDLGQAK.R	153E-07	2,55	0,35	856,4	2	13/18
926	R.QQIEEATSDYDREK.L	456E-07	2,54	0,31	303,5	5	17/52
1052	K.ATLEDLGQAK.R	542E-07	2,46	0,38	833,2	1	13/18
1539	R.EIELEDKFENMGAQMVK.E	617E-06	2,16	0,35	591,5	1	16/32
929	R.QQIEEATSDYDREK.L	280E-06	2,05	0,16	485,5	5	20/52
10	K-Cl co-transporter 3a [Rattus norvegicus]	435E-11	110,25		142988,6	6264554	26 (26 0 0 0 0)
1626	R.IFTVAQLEDNSIQMK.K	784E-07	4,98	0,61	1714,0	1	20/28
1622	R.IFTVAQLEDNSIQMK.K	838E-08	4,85	0,58	1434,9	1	21/28

1259	K.HNTVVMGWPNQWR.Q	168E-10	4,64	0,59	1660,8	1	19/24
1130	R.VTTAAHLALLVAK.N	435E-11	4,39	0,54	1967,3	1	21/24
1515 - 1517	R.IFTVAQLEDNSIQMK.K	197E-06	4,31	0,51	1283,1	1	19/28
2426	R.NPEGDENYMEFLEVLTEGLER.V	582E-06	4,23	0,35	947,4	1	27/80
1134	R.VTTAAHLALLVAK.N	117E-10	4,13	0,54	1601,0	1	20/24
2313 - 2315	R.NPEGDENYMEFLEVLTEGLER.V	797E-08	3,94	0,46	812,9	1	19/40
1476	K.EGISHLIQSCGLGGMK.H	575E-09	3,73	0,47	1491,3	1	22/30
2427	R.NPEGDENYMEFLEVLTEGLER.V	418E-09	3,50	0,53	979,1	1	18/40
1380 - 1382	K.LVLLNMPGPPR.N	220E-06	3,40	0,31	960,2	1	16/20
1523	R.IFTVAQLEDNSIQMK.K	288E-05	3,38	0,40	652,0	1	17/28
1478	K.EGISHLIQSCGLGGMK.H	384E-04	3,20	0,14	1422,1	1	28/60
1088	R.LTSIGSDEDEETETYQEK.V	135E-08	3,18	0,48	729,3	1	17/34
1530	R.IFTVAQLEDNSIQMK.K	169E-04	3,10	0,27	393,9	1	14/28
1469	K.EGISHLIQSCGLGGMK.H	701E-09	3,09	0,42	1007,9	1	17/30
1487	K.NWRPQLLVLLK.L	345E-05	3,08	0,18	806,0	1	14/20
1724	K.DLATFLYHLR.I	680E-06	3,06	0,33	1368,9	1	16/18
1100	R.LTSIGSDEDEETETYQEK.V	874E-10	3,05	0,52	858,8	1	19/34
1220	R.LLTFASQLK.A	873E-07	2,74	0,25	701,6	1	14/16
1217	R.LLTFASQLK.A	190E-05	2,30	0,25	685,7	1	13/16
1533	R.IFTVAQLEDNSIQMK.K	537E-03	2,30	0,24	190,6	1	11/28
1365	K.HNTVVMGWPNQWR.Q	914E-03	2,25	0,37	565,6	2	12/24
897	K.LNEVIVNK.S	430E-03	2,14	0,07	398,5	5	9/14
1391	K.LVLLNMPGPPR.N	324E-04	2,09	0,42	345,0	1	14/20
1362	K.HNTVVMGWPNQWR.Q	376E-05	2,09	0,11	456,0	1	12/24
11	Tubulin, alpha 1 [Rattus norvegicus]	587E-11	62,18		50131,7	3832824	9 (8 0 0 0 1)
1631	K.AYHEQLSVAEITNACFEPANQMV.K.C	858E-04	3,68	0,42	542,6	1	25/92
1149 - 1151	R.NLDIERPTYTNLNR.L	135E-08	3,37	0,19	412,8	1	15/26
1350	K.VGINYQPPTVVPGGDLAK.V	398E-09	3,33	0,30	440,1	1	18/34
1347	K.VGINYQPPTVVPGGDLAK.V	587E-11	3,31	0,22	426,6	1	17/34
1166	R.DVNAAIATIK.T	229E-06	3,11	0,32	1474,4	1	17/18
1301	R.QLFHPEQLITGK.E	329E-08	2,67	0,40	390,1	1	15/22
1977 - 1979	R.FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR.I	742E-03	2,41	0,00	530,3	1	23/80
1302	R.QLFHPEQLITGK.E	716E-05	2,29	0,33	261,4	3	16/44
1464 - 1466	R.IHFPLATYAPVISA EK.A	117E-04	2,19	-	521,4	1	22/60
12	Nono protein [Rattus norvegicus]	650E-11	10,23		65768,5	6266705	2 (2 0 0 0 0)
2364	R.NLPQYVSNELLEAFSVFGQVER.A	650E-11	4,64	0,49	1368,7	1	24/44
2367	R.NLPQYVSNELLEAFSVFGQVER.A	432E-09	2,97	0,49	756,3	1	19/44
13	Glutathione S-transferase, mu 1 [Mus musculus]	749E-11	40,23		25953,1	2838620	6 (6 0 0 0 0)
2154 - 2156	K.VTYVDFLAYDILDQYR.M	118E-07	4,58	0,32	1672,8	1	29/60
1175	R.MLLEYTDSSYDEKR.Y	152E-09	4,24	0,39	1640,5	1	20/26
1109	R.ADIVENQVMDTR.M	195E-08	4,11	0,49	1643,5	1	17/22
1179	R.MLLEYTDSSYDEKR.Y	979E-10	3,98	0,40	1600,0	1	19/26

1680	R.HHSREAVIKQTLER.E	203E-05	3,19	0,19	612,3	1	16/26
52	GSTP1_CRIMI Glutathione S-transferase P (GST class-pi) 1338	224E-05	8,18		23454,2	1346208	1 (0 1 0 0 0)
53	heat shock protein 70	K.ALPGHLKPFETLLSKNQGGK.A	224E-05	3,55	0,33	809,8	1 27/76
		225E-05	10,21		71437,6	3799386	1 (1 0 0 0 0)
						6	
	1182	K.NQVAMNPSNTIFDAK.R	225E-05	4,14	0,01	735,2	2 17/28
54	Hsc70-ps1 [Rattus norvegicus]	225E-05	8,21		70884,4	56385	1 (0 1 0 0 0)
	1182	K.NQVAMNPTNTVFDK.R	225E-05	4,11	0,45	866,7	1 18/28
58	Vinexin [Mus musculus]	342E-05	8,14		4614,5	7421897	1 (0 1 0 0 0)
	2360	K.QRLQLWDQFLQELTRILTHLNPF	342E-05	2,40	0,07	366,9	1 20/88
60	specifically androgen-regulated protein [Rattus 400]	409E-05	10,16		90829,4	6265927	2 (2 0 0 0 0)
		K.SATQTNSVSEAPEVFLEEPKKGQT R.Q	409E-05	2,66	0,04	553,1	3 27/96
	403	K.SATQTNSVSEAPEVFLEEPKKGQT R.Q	479E-03	2,54	0,03	501,1	3 26/96
63	clathrin heavychain [Mus musculus]	470E-05	10,14		114171,1	7413798	1 (1 0 0 0 0)
	2229	K.AFMTADLPNELIELLEK.I	470E-05	2,80	0,26	503,9	1 18/32
64	SRP68 [Mus musculus]	482E-05	8,12		70578,5	2632877	1 (0 1 0 0 0)
	1902	K.CSLQAAAILDANDSHQTDTSYQV K.D	482E-05	2,32	0,11	497,6	2 23/92
69	D Chain D, 1.25a Resolution Structure Of Human Hemoglobin In The Deoxy Form	760E-05	10,12		15857,3	9327924	1 (1 0 0 0 0)
	971	K.VVAGVANALAHKYH	760E-05	2,46	0,28	317,3	1 23/52
71	Short transient receptor potential channel 4 (Tr 1721)	780E-05	10,12		79725,0	7200517	1 (1 0 0 0 0)
		R.ANWSAYDPLLISEGLFAIAKVLFS LR.P	780E-05	2,48	0,16	329,8	3 19/100
72	Tubulin beta 5 [Mus musculus]	784E-05	10,11		49608,0	1284675	1 (1 0 0 0 0)
	1035	R.ISVYYNEATGGK.Y	784E-05	2,17	0,23	553,8	1 13/22
73	Hypothetical protein MGC67567 [Rattus norvegicus]	784E-05	10,11		40878,9	2766735	2 (1 0 0 1 0)
	1481	R.THFTKFKQIDILIEAFEKNR.F	109E-03	2,26	0,15	579,8	1 15/36
	1608 - 1610	R.THFTKFKQIDILIEAFEKNR.F	784E-05	2,11	0,03	579,5	1 15/36
74	glutathione transferase (EC 2.5.1.18) mu2 - mous 846	791E-05	10,11		25624,1	3485980	1 (1 0 0 0 0)
		K.ITQSNAILR.Y	791E-05	2,30	0,24	1224,4	1 15/16
75	Ras association and pleckstrin homology domains	801E-05	6,17		81866,1	7200876	5 (4 0 1 0 0)
	1440 - 1442	K.QDLKGSMSAEISQQLNLTSVK.D	870E-05	3,38	0,12	333,5	2 18/42
	1598	K.QDLKGSMSAEISQQLNLTSVK.D	840E-04	3,25	0,20	307,6	3 17/42
	1589	K.QDLKGSMSAEISQQLNLTSVK.D	562E-03	3,08	0,22	322,7	2 17/42
	1436	K.QDLKGSMSAEISQQLNLTSVK.D	801E-05	2,44	0,13	650,2	2 26/84
	1544	K.QDLKGSMSAEISQQLNLTSVK.D	724E-03	2,36	0,06	575,1	5 22/84
78	Suppressor of cytokine	886E-05	10,13		44530,9	7208885	1 (1 0 0 0 0)

578		K.GVQCEVKLVESGGGLVQGRPLK.L	307E-04	2,40	0,17	1120,6	1	29/88
107	cytoskeleton associated protein 2, MAP [Rattus norvegicus]		363E-04	8,10		65739,4	62641159	1 (0 1 0 0 0)
	1817	K.EEILATLNLIHNIPDAKLVK.Y	363E-04	2,10	0,20	201,5	4	11/42
108	Golgi autoantigen, golgin subfamily B member 1 (1178)		366E-04	4,11		356494,2	72004637	1 (0 0 0 1 0)
		R.ELDMMNEGQSEGRK.N	366E-04	2,11	0,13	396,5	2	22/56
109	Ankyrin-1 (Erythrocyte ankyrin) (Ankyrin R), par 1116		402E-04	10,12		349359,3	72015368	1 (1 0 0 0 0)
		R.GHVKVMEYLIQGGSNVKK.D	402E-04	2,37	0,09	620,9	1	24/72
110	OTTHUMP00000028696 [Rattus norvegicus] 1116		402E-04	8,11		370738,9	62659064	1 (0 1 0 0 0)
		K.QEETDLLANSEPEKVVEIK.V	402E-04	2,16	0,09	393,2	3	19/72
111	Low-affinity inorganic phosphate (Pi) transporter, involved in activat 980		404E-04	10,11		102474,5	10383798	1 (1 0 0 0 0)
		K.YPLPKPINLK.F	404E-04	2,28	0,04	739,4	2	14/18
112	Smer8 protein [Rattus norvegicus] 2274 - 2276		457E-04	6,13		104932,3	62656181	2 (0 1 1 0 0)
	2334	R.QTSFLKLNGLVNE DIR.V	457E-04	2,49	0,09	607,2	2	22/64
		R.QTSFLKLNGLVNE DIR.V	923E-03	2,17	0,31	599,8	4	14/32
113	Epilepsy holoprosencephaly candidate-1 protein (286)		490E-04	10,15		56320,6	72051860	1 (1 0 0 0 0)
		K.ETCSTTLVLQDIELQPGKNELEFK.F	490E-04	2,92	0,04	567,7	4	25/92
114	CYP71B36; heme binding / iron ion binding / monooxygenase/ oxygen bind 1287		493E-04	8,12		57163,6	15231541	1 (0 1 0 0 0)
		K.RVQSFQPIKEDEVK.K	493E-04	2,38	0,04	1470,7	1	27/52
116	mKIAA0179 protein [Mus musculus] 1499		505E-04	10,17		70800,2	37359820	1 (1 0 0 0 0)
		R.GVFEVIVDQSACVPEESVEERK.T	505E-04	3,41	0,23	689,1	1	23/84
117	unnamed protein product [Mus musculus] 2316 - 2318		601E-04	10,14		57464,9	74208657	2 (1 0 1 0 0)
	2429	K.DIAYQLMHNKIDIDVIMGGGRK.Y	601E-04	2,88	0,04	609,5	5	24/84
		K.DIAYQLMHNKIDIDVIMGGGRK.Y	215E-03	2,44	0,08	578,5	3	24/84
118	RIKEN cDNA 6230416J20 [Rattus norvegicus] 1229		616E-04	8,10		127034,1	62649190	1 (0 1 0 0 0)
		R.VVLSDSPQLSEGK.E	616E-04	2,01	0,42	544,6	4	12/24
120	mKIAA1764 protein [Mus musculus] 1803		644E-04	6,15		119866,4	50511097	1 (0 0 1 0 0)
		K.NFSDNSTYRSLVEQLDQEREMR.W	644E-04	2,95	0,06	444,8	3	24/84
121	mKIAA1024 protein [Mus musculus] 1743		656E-04	8,11		101650,3	50510763	1 (0 1 0 0 0)
		R.PENVHHSEEELKSSVCKLVLR.I	656E-04	2,24	0,14	233,9	3	12/40
122	protocadherin gamma A2 [Rattus norvegicus] 1400		716E-04	10,15		101446,5	80751169	2 (1 1 0 0 0)
	1397	K.YKLNSNDHFSLDVRTGADGNK.Y	866E-03	2,56	0,14	695,4	1	27/80
		K.YKLNSNDHFSLDVRTGADGNK.Y	716E-04	2,53	0,02	864,8	1	26/80
127	NonO/p54nrb homolog [Rattus norvegicus] 1041		902E-04	10,11		75439,4	68534278	1 (1 0 0 0 0)
		R.FAQHGTFEYEYSQR.W	902E-04	2,21	0,16	466,7	4	17/52

128	mKIAA0154 protein [Mus musculus] 1971 - 1973		977E-04	10,15		78437,4	3910461	1 (1 0 0 0 0)
		K.LLHEMLLHYSQEYSSDADKELM K.E	977E-04	3,01	0,11	579,0	1	24/88
130	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14 [Mus musculus] 1436		998E-03	8,13		53926,9	4705904	1 (0 1 0 0 0)
		K.LQNGDLLHMIPQHCSNSELGK.A	998E-03	2,54	0,07	674,6	1	26/80
131	G protein-coupled receptor 142 [Rattus norvegicus] 1425		998E-03	10,12		55665,5	6265740	1 (1 0 0 0 0)
		R.ATGRSIGANSSSESQCGANSSS EGR.C	998E-03	2,42	0,24	336,3	3	21/104
132	polycomb group ring finger 6 [Mus musculus] 2030		999E-03	10,11		25059,3	9440922	1 (1 0 0 0 0)
		- .MSLPSSSLAKPVVESSPEAQGGLG DK.H	999E-03	2,22	0,12	591,3	1	28/104
134	TPA: TPA_exp: embryonic type II keratin 1 [Mus musculus] 1079		999E-03	10,11		61321,6	5711377	1 (1 0 0 0 0)
		K.LLRDYQAMLGAKLSLDVEIATYR .Q	999E-03	2,20	0,08	229,6	1	21/88
135	beta-catenin [Tripneustes gratilla] 1613		1 000E-03	10,13		89304,7	387882	1 (1 0 0 0 0)
		K.MIVSQMAGVEALVQTLMKAGDR .E	1 000E-03	2,69	0,05	797,3	2	24/84
138	ATP citrate lyase [Gallus gallus] 1572 - 1574		100E-02	10,17		121054,4	7189638	1 (1 0 0 0 0)
		K.GVTNIGPATVGGIKPGCFKIGNTG GMLDNILASK.L	100E-02	3,44	0,05	367,7	9	25/132
140	CP341_MOUSE Cytochrome P450 3A41 1502		100E-02	10,16		57921,8	2421154	1 (1 0 0 0 0)
		R.EFGPVGIMSKAISISKDEEWK.R	100E-02	3,15	0,05	989,7	2	27/80
143	PREDICTED: similar to CG2864-PA, partial [Strongylocentrotus purpuratu 2438		100E-02	10,14		159962,0	7211513	1 (1 0 0 0 0)
		R.TKAATVMAGLVHFLEAIATQEER. I	100E-02	2,84	0,08	353,3	3	13/44
144	SH3 domain protein 4, Vinexin [Mus musculus] 1452		100E-02	10,14		82298,5	6755504	1 (1 0 0 0 0)
		K.NWLEGEHHGRLGIFPANYVEVLP ADEIPK.P	100E-02	2,82	0,05	391,6	1	26/112
145	RIKEN cDNA 2410004F06 [Rattus norvegicus] 459 - 461		100E-02	10,14		55136,3	6263941	2 (2 0 0 0 0)
		K.VCVNDDLVAKNFAYYVSPMGNK .N	998E-03	2,52	0,17	671,4	4	24/84
	1355	K.VCVNDDLVAKNFAYYVSPMGNK .N	100E-02	2,32	0,04	647,0	1	22/84
146	cell adhesion molecule- related/down-regulated by oncogenes [Rattus norv 1725		100E-02	10,14		136117,8	8393087	1 (1 0 0 0 0)
		K.WLMYSTGNYIILPSGNLQILNVSS KDKGSYK.C	100E-02	2,80	0,34	342,1	3	26/120
148	cation-transporting ATPase [Arabidopsis thaliana] 2267		100E-02	10,14		131031,3	1523779	1 (1 0 0 0 0)
		R.IPFAGKVDLCCFDKTGTLTSDDM EFR.G	100E-02	2,72	0,14	287,9	8	14/50
150	GP125_MOUSE Probable G-protein coupled receptor 125 precursor 1955		100E-02	10,13		144631,0	5040041	1 (1 0 0 0 0)
		R.NASVCQAVGILHYSTLATVWLWV GVTAR.N	100E-02	2,67	0,02	485,2	3	26/108

1577		R.EQWCSERLDNQKELMEELYEEK. L	100E-02	2,05	0,05	223,9	1	20/84
194	putative protein kinase [Rattus norvegicus] [MAS 854	K.VNHPNIVSLLQVIENKTR.I	100E-02	10,10		63289,9	6263874	1 (1 0 0 0 0) 7
195	unnamed protein product [Mus musculus] 1497	R.STSDGPSSATNLIEDPLHDKLWKC SL	100E-02	10,10		12900,4	7414138	1 (1 0 0 0 0) 8
199	bicaudal D homolog 1 isoform 1 [Rattus norvegicu 2057	K.EKRLTVAPPDCQQAASVPPQCS QLAGR.Q	100E-02	10,10		110712,7	6264845	1 (1 0 0 0 0) 5
203	RP11-506B15.1 protein isoform 1 [Mus musculus] [403	K.LPLDYRAPFLLTLEPPGPLPLVSG R.S	100E-02	8,16		92105,0	9437222	1 (0 1 0 0 0) 6
205	unnamed protein product [Mus musculus] 1803	K.ELSEARIRTVMVTGDNLQTAITV AK.N	100E-02	8,15		136627,5	7415290	1 (0 1 0 0 0) 9
208	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17 1965 - 1967	R.SPVIGQGSPNLRSLMVDEK.P	100E-02	8,14		37297,3	7205908	1 (0 1 0 0 0) 9
209	unnamed protein product [Mus musculus] 693	R.QQEQSFQDQNTLAAEARETR.R	100E-02	2,79	0,42	534,7	1285050	1 (0 1 0 0 0) 2
210	Ki-67 [Mus musculus] 1326 - 1328	R.QQEQSFQDQNTLAAEARETR.R	100E-02	8,14		34175,7	1285050	1 (0 1 0 0 0) 4
214	titin isoform N2-B [Mus musculus] 1601	R.QQEQSFQDQNTLAAEARETR.R	100E-02	2,12	0,02	605,2	1177528	1 (0 1 0 0 0) 3
219	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10) [Mus 1049	K.QTQTKVAKHVPPK.Q	100E-02	8,13		324229,0	1177528	1 (0 1 0 0 0) 2
219	heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10) [Mus 1043	K.QLPPEIELDADLR.K	100E-02	2,67	0,52	712,8	15/24	
223	unnamed protein product [Mus musculus] 1535	R.MLPPEIELDADLR.K	100E-02	8,13		2984010,0	7781269	1 (0 1 0 0 0) 9
224	protein-O- mannosyltransferase 1 [Rattus norvegicus] 1439	R.MLPPEIELDADLR.K	100E-02	2,59	0,42	785,3	14/24	
226	ATP binding / carbohydrate binding / kinase/ protein kinase/ protein s 1793	K.FLLLFDRVLVK.R	100E-02	8,12		6859,8	9437213	2 (0 1 1 0 0) 0
227	Sodium channel, voltage- gated, type III, beta [Rattus norvegicus] 1917	K.FLLLFDRVLVK.R	100E-02	2,43	0,31	1007,8	1	16/20
231	DYHC_TRIGR Dynein beta chain, ciliary 1653	K.FLLLFDRVLVK.R	100E-02	2,02	0,30	594,2	3	12/20
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	K.EIQNVSTSFEEEMDEQVK.S	100E-02	8,12		15269,3	1286141	1 (0 1 0 0 0) 5
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	R.SMGREDTLGVLPSSLFCKMLR.F	100E-02	2,31	0,15	354,3	5	20/80
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	K.KLCDFYGACGPFGLCVMSPPMC KCFR.G	100E-02	2,31	0,15	354,3	5	20/80
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	R.VCFPVCVEVPSETEAVQGNPMK.L	100E-02	8,11		90272,9	1840721	1 (0 1 0 0 0) 1
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	K.FLVLINDLLASGEIPDLFADDEVE NIIGGVR.N	100E-02	2,27	0,24	125,4	4	12/52
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	R.VCFPVCVEVPSETEAVQGNPMK.L	100E-02	8,11		24783,4	4747779	1 (0 1 0 0 0) 0
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	R.VCFPVCVEVPSETEAVQGNPMK.L	100E-02	2,26	0,09	795,8	1	24/84
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	R.VCFPVCVEVPSETEAVQGNPMK.L	100E-02	8,11		511454,9	118965	1 (0 1 0 0 0)
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	R.VCFPVCVEVPSETEAVQGNPMK.L	100E-02	2,23	0,07	230,8	2	26/120
235	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 12 homolog [Mus	R.VCFPVCVEVPSETEAVQGNPMK.L	100E-02	8,11		231662,4	3346896	1 (0 1 0 0 0) 7

m								
251		K.GSGFTVPGGTEELPEEEGGGSSG R.R	100E-02	2,17	0,04	559,1	4	25/96
237	restin [Rattus norvegicus]		100E-02	8,11		148186,6	3850516 8	1 (0 1 0 0 0)
	1106	R.IKELEQSLLFEK.T	100E-02	2,14	0,13	496,9	1	17/44
238	NAD-dependent epimerase/dehydratase:Shor t-chain dehydrogenase/reduct 1377 - 1379		100E-02	8,11		29611,7	9020445 5	1 (0 1 0 0 0)
		K.ALWYLERLSPALSMRTAAAALK. R	100E-02	2,14	0,20	1070,5	1	29/84
239	OTTHUMP00000040391 [Rattus norvegicus] 1827		100E-02	8,11		129542,2	6266601 5	1 (0 1 0 0 0)
		R.EVEALNNTLEELRLEK.K	100E-02	2,14	0,53	469,0	2	14/30
240	TRFE_RAT Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1- metal- 1715		100E-02	8,11		76314,6	6175089	1 (0 1 0 0 0)
		R.IPSHAVVARNGDGKEDIWEILK. V	100E-02	2,13	0,20	362,9	1	23/88
249	similar to solute carrier family 34 (sodium phosphate), mem 1604		100E-02	6,14		64706,7	7213588 6	2 (0 1 1 0 0)
	1601	R.NNVKIEILKVITK.P	100E-02	2,83	0,40	584,9	4	13/24
		R.NNVKIEILKVITK.P	100E-02	2,56	0,45	805,3	2	14/24
254	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide musculus] [Mus 1202		100E-02	6,10		15501,8	5886494 6	1 (0 0 1 0 0)
		R.DKGRLIPK.D	100E-02	2,01	0,25	535,8	4	9/14
260	hypothetical protein XP_580254 [Rattus norvegicus] 1974 - 1976		100E-02	4,11		58773,2	6264396 0	1 (0 0 0 1 0)
		K.VVDISVAGMALALGISVVGRALG ISVVGR.A	100E-02	2,16	0,65	265,0	3	14/56
261	putative mannosyltransferase musculus] [Mus 1761		100E-02	2,15		53790,8	1847828 4	1 (0 0 0 0 1)
		R.FHIYFPVLNIMAARGCTYILNKK. S	100E-02	2,23	-	333,0	2	22/92
262	Rho-GTPase-activating protein 6 (Rho-type GTPase 1773		100E-02	2,12		130687,9	7200687 1	1 (0 0 0 0 1)
		K.LSNSLEQQKEALR.L	100E-02	2,29	-	660,5	5	14/24
263	KIAA0303 [Rattus norvegicus] 1002		100E-02	2,11		265338,1	6264284 8	1 (0 0 0 0 1)
		R.EPSSANLKVNK.S	100E-02	2,24	-	836,9	1	16/20
266	zinc finger protein 565 [Rattus norvegicus] [MAS 1616		100E-02	2,10		76842,6	6263933 0	1 (0 0 0 0 1)
		R.AVMLDNYSNLLSLSLANMKPR.V	100E-02	2,09	-	549,9	5	22/80

Ces résultats proviennent des complexes obtenus par GST pull-down réalisé avec le domaine C-terminal de KCC3 (tagué GST) et un extrait protéique total de cerveau de souris. Les contaminants d'origine bactérienne ont été éliminés des résultats présentés ici.

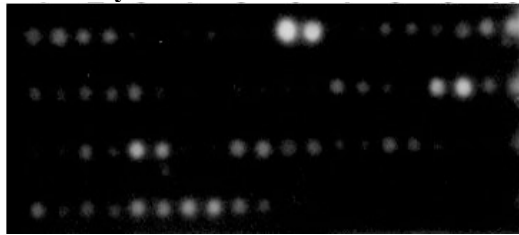
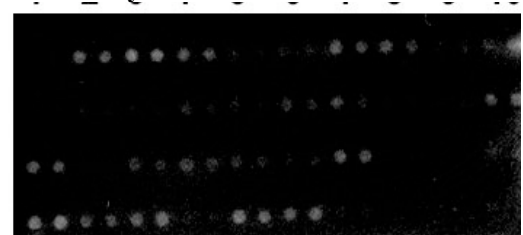
Tableau X

Conséquences d'une expression anormale de KCC3.

NSMH/ACC	Cancer
Perte de fonction (Truncation ou rétention dans le RE)	Sur-expression (Augmentation de la transcription)
DÉFAUT de KCC3 Gonflement axonal: RVC- Agenesie du corps calleux (CNS): Migration-	EXCÈS de KCC3 Prolifération Invasion: Migration+++

Figure 13

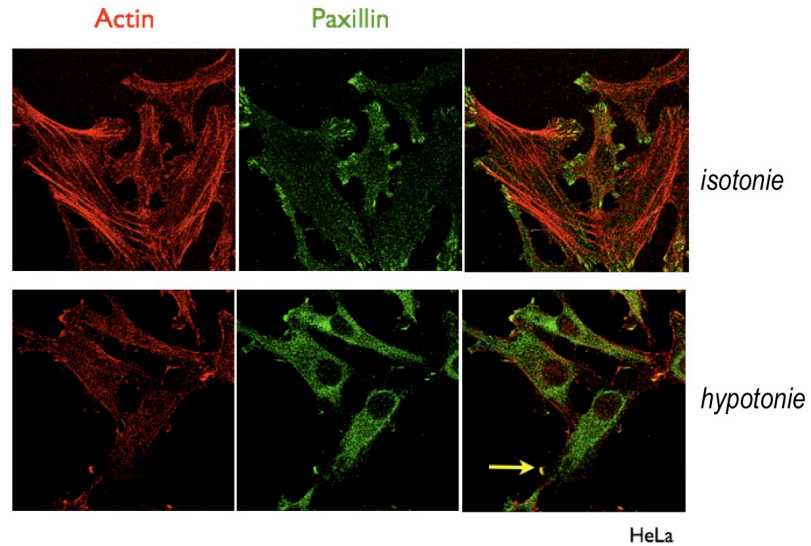
Profil d'interaction entre le 15mère de KCC3 contenant le motif poly-proline et des domaines SH3 connus (SH3-array II et III).

SH3-array II**SH3-array III**

Le panneau à *gauche* représente le profil obtenu avec le 15mère sauvage (peptide wt) et celui à *droite* correspond au profil obtenu avec le peptide muté pour le motif PR (peptide mPR). L'expérience a été effectuée en suivant le protocole d'utilisation du manufacturier (*Panomics*). Les domaines SH3 de la vinexine ont été entourés *en rouge*. Les domaines SH3 de Vav et Vav3 ont été entourés *en blanc*.

Figure 14

Les variations de tonicité mènent à des remaniements spectaculaires du cytosquelette cortical.



Des cellules HeLa ont été mises en culture et soumises à des conditions isotoniques ou hypotoniques pendant 5 min. Par la suite, ces cellules ont été fixées dans 5% de glutaraldehyde et immuno-marquées en suivant un protocole classique (voir *Article 2* pour obtenir un protocole d'immuno-marquage plus détaillé). L'actine est indiquée en rouge (phalloïdine) et la paxilline (adhésions focales) est indiquée en vert. Noter la perte de filaments d'actine et la forte relocalisation corticale de l'actine après 5 minutes en conditions hypotoniques.

Conclusion

Il semble qu'il existe plusieurs catégories de mécanismes qui mènent à l'inactivation de KCC3 :

- Le transit de la protéine mutée jusqu'à la membrane plasmique est sévèrement affecté par rétention intracellulaire. Ce défaut peut être corrigé en partie en culture cellulaire.
- la localisation à la surface cellulaire est perturbée. Ainsi, seuls des quantités réduites de co-transporteur non-fonctionnel parviennent à la membrane.
- la fonction intrinsèque du co-transporteur est perdue. Cette perte de fonction semble être liée à la rupture des interactions fonctionnelles avec CK-B et potentiellement avec des éléments du cytosquelette.

Bien que de nombreux aspects moléculaires, cellulaires et cliniques restent encore non-élucidés, ceci amène à une meilleure compréhension de la maladie et ouvre la voie à de nouvelles avenues thérapeutiques. Ces différents points sont discutés dans ce chapitre.

Synopsis

Identification de la mutation qui cause la NSMH/ACC le plus communément hors du Québec

Avec l'aide de cliniciens d'Afrique du Sud, de Turquie et des Pays Bas et la collaboration du Dr Dupré, nous avons obtenu des échantillons d'ADN d'individus présentant tous les aspects de la maladie. Le séquençage des 26 exons du gène KCC3 chez ces patients a mené à l'identification de deux mutations dans l'exon 22 du gène. Parmi ces mutations, la R1011X est retrouvée dans trois populations d'origines différentes, ce qui en fait la mutation retrouvée le plus communément hors de la province du Québec. R1011X est dépourvue des 140 derniers acides aminés de la protéine, soit ~12% de la protéine totale et soit aussi trois fois moins que la protéine tronquée qu'on retrouve au Québec.

Une fois de plus, nous avons rapporté des cas de NSMH/ACC observés hors du Québec. Nous décrivons pour la seconde fois des cas de NSMH/ACC en Turquie où les mariages consanguins sont favorisés (voir aussi Howard et al. 2002). Ce comportement culturel augmente la fréquence des maladies rares ou orphelines dans la population Turque. Nous présentons également pour la première fois plusieurs cas indépendants de NSMH/ACC dans la population Afrikaners (Afrique du Sud). Cette population présente certaines similarités avec la population Québécoise puisqu'elle s'est constituée depuis un nombre restreint de colons; Hollandais dans le cas de l'Afrique du Sud. D'ailleurs, les analyses d'haplotypes réalisées sur les membres de la famille démontrent une certaine apparenté entre les ascendants des malades. Ainsi, l'apparition des quelques cas rapportés dans ce pays pourrait être due, comme au Québec, à un effet fondateur. Des études de population chez les Afrikaners pourront dans le futur déterminer la fréquence de l'allèle muté dans cette population.

La perte des 140 derniers acides aminés de KCC3 mène à sa perte de fonction

La mutation retrouvée au Québec (T813X) inactive KCC3 dans les études de flux réalisées dans les ovocytes de Xénope *via* l'élimination des 336 derniers acides aminés. Nous avons donc testé de façon similaire la fonction du co-transporteur qui n'est tronqué en C-terminus que de 140 acides aminés. Ce dernier co-transporteur muté est également non fonctionnel dans les études de flux réalisées dans les ovocytes de Xénope. Ceci suggère que les 140 derniers acides aminés de KCC3 sont fonctionnellement requis.

En comparaison à ce qui est observé avec la forme sauvage de la protéine KCC3, la forme tronquée R1011X semble sous-représentée au niveau de la membrane plasmique. Ceci est en accord avec le fait qu'il existe un motif hydrophobique (VLLV) retrouvé dans le C-terminus de plusieurs CCCs et qui est crucial dans leur transit jusqu'à la membrane plasmique. L'importance de ce motif est discutée dans l'*Article 3*. Cette sous-représentation de la forme tronquée au niveau de la membrane plasmique peut aussi être liée à des anomalies d'expression du co-transporteur. Nous en avons d'ailleurs observé de nombreux indices comme la sous-représentation systématique de R1011X en immuno-blot (*Article 2 Figure 5, Article 3 Figure S2*). Afin de déterminer s'il existe une instabilité protéique, il faudra suivre la vitesse de 'turn-over' de la forme mutée par analyse pulse-chase : il demeure néanmoins possible qu'un résultat significatif (lors des expériences de flux) ne puisse être observé. C'est pourquoi, il sera peut-être nécessaire d'utiliser des composés chimiques comme la lactacystin et le MG-132 afin d'inhiber la dégradation des protéines.

Les 18 derniers acides aminés de KCC3 permettent une interaction directe et fonctionnelle avec CK-B

Plus de 400 acides aminés composent le domaine C-terminal de KCC3 et sont susceptibles d'interagir avec des partenaires protéiques, en particulier avec des partenaires de co-transporteurs apparentés. Hors, il a été rapporté que la créatine kinase spécifique au cerveau (CK-B) interagit avec KCC2 et que cela implique le C-terminus. Nous avons montré à notre tour que CK-B et KCC3 interagissent également. Cette interaction se fait *via* les 18 derniers acides aminés de la protéine, comme l'ont démontré des expériences de double hybride et de GST pull-down. En conséquence, l'interaction entre le co-transporteur et CK-B est perturbée lorsque les 140 derniers acides aminés de KCC3 sont perdus. De plus, l'inhibition des créatines kinases par du DNFB mène à l'inactivation de KCC3 dans les études de flux réalisées dans les ovocytes de Xénope. Tout cela démontre l'importance fonctionnelle de CK-B pour KCC3.

Nous avons montré ici que CK-B interagit avec une région totalement distale du C-terminus de KCC3. Cette interaction semble être abolie quelque soit la mutation tronquante mise en jeu (voir *Article 3*). Cependant, il existe aussi des mutations non tronquantes (R207C et G539D) qui permettent, a priori, l'expression d'une protéine pleine longueur (Uyanik et al. 2006 ; Rudnik-Schöneborn et al 2009). L'interaction de ces formes mutées non tronquées de KCC3 avec CK-B semble être maintenue. De plus les souris KO pour CK-B n'ont pas de phénotypes neurologiques majeurs (Jost et al 2002). Tout ceci suggère qu'il reste probablement à identifier d'autres facteurs (propriétés intrinsèques ou autres partenaires protéiques) qui régulent l'activité de KCC3.

Toutes les expériences fonctionnelles ont été réalisées dans l'ovocyte de Xénope qui bien qu'il soit un modèle fort utile pour étudier la fonction d'un co-transporteur n'en demeure pas moins peu représentatif de la situation physiologique réelle des neurones humains. Il existe une forme dominante négative de CK-B (DN-CKB) qui est une protéine considérée comme 'morte' au niveau de son activité kinasique et qui interfère avec la fonction des CK-B sauvages par dimérisation (Inoue et al 2006). Cette forme a l'avantage

d'être non 'toxique' pour les cellules de mammifères, contrairement à l'inhibiteur non spécifique de créatine kinase (DNFB). Pour déterminer l'importance de la fonction de CK-B dans le système nerveux de mammifère, DN-CKB sera exprimée dans des neurones en culture, puis nous ferons varier la tonicité du milieu de culture. Des anomalies de régulation du volume cellulaire seront suivies en quantifiant le gonflement axonal tel que celui observé chez la souris *Kcc3^{-/-}* et chez les patients NSMH/ACC (Dupre et al. 2003).

L'identification de la mutation NSMH/ACC la plus distale appuie l'importance fonctionnelle de l'interaction entre KCC3 et CK-B

Le recrutement d'individus apparentés issus d'Algérie, qui avaient les manifestations les plus sévères de la maladie, a permis d'identifier par séquençage direct une nouvelle mutation dans l'exon 25 du gène *KCC3*. Cette mutation élimine les 17 derniers acides aminés de la protéine et mène, elle aussi, à la perte de fonction du co-transporteur dans les études flux réalisées dans les ovocytes de Xénope. Cette troncature perturbe l'interaction fonctionnelle avec CK-B et confirme le lien entre ce partenaire et la perte de fonction de *KCC3* dans la NSMH/ACC.

Cependant, à la suite de ce travail, nous ne disposons toujours pas d'une caractérisation structurale précise et fine de l'interaction *KCC3/CK-B*. Parmi les 17 derniers acides aminés du C-terminus il est vraisemblable que certains résidus soient plus nécessaires que d'autre pour que cette interaction soit possible. Une meilleure caractérisation nécessitera de tester le potentiel d'interaction avec CK-B avec des polypeptides C-terminaux encore plus petit puis de muter chaque résidus restant. Enfin, pour que cette étude soit complète il faudra délimiter le domaine ou motif de CK-B qui permet l'interaction avec *KCC3*.

La rétention dans le RE est un mécanisme d'inactivation de KCC3

La NSMH/ACC est généralement causée par des mutations qui conduisent à l'apparition de codons stop prématurés. Cependant, il existe un échange d'acide aminé (R207C, mutation non-troncante) qui cause tout de même une NSMH/ACC légèrement moins sévère. Nous avons confirmé que cette mutation atypique conduit elle aussi à l'inactivation de KCC3 à l'aide des études de flux réalisées dans les ovocytes de Xénope. Cependant, le transit de ce mutant est altéré en raison de structures dimériques particulièrement stables qu'on peut observer par immunoblot. Des études d'immunolocalisation ont permis de montrer que la protéine R207C est en fait maintenue captive dans le RE, ce qui perturbe son transit jusqu'à la membrane plasmique. Cependant, cette rétention peut être soulagée dans des cellules en culture par l'application de curcumin, un composant connu pour son action sur les protéines chaperonnes du RE. De plus, l'immunomarquage de KCC3 sur des échantillons de cerveau d'un patient québécois montre une distribution anormale de KCC3 tronquée, suggérant que le défaut de transit de KCC3 pourrait être un pathomécanisme important de la NSMH/ACC.

Le transit intracellulaire de KCC3 est affecté par des mutations NSMH/ACC qu'elles soient tronquantes ou non. Il semble qu'une tétrade hydrophobe C-terminale (Nezu et al. 2009) et la dimérisation anormale du co-transporteur en soient responsables. Le rôle du motif hydrophobe et du résidu Arg²⁰⁷ situé dans le 1er domaine transmembranaire dans le transit de KCC3 vers la membrane plasmique devra être confirmé par mutagénèse.

Il semble que le curcumin soulage la rétention intracellulaire de la forme mutée R207C. Comme il a été montré que ce composé alimentaire diminue la rétention d'autres types de canaux prisonniers dans le RE, il est fort possible que l'action du curcumin soit similaire dans notre propre étude. Cependant, le curcumin agit sur de nombreuses voies de la maturation protéique via des processus qui sont encore mal compris. C'est pourquoi il

sera intéressant de compléter l'étude en utilisant des agents chimiques tels que des inhibiteurs des pompes calciques dont l'effet sur l'activité des chaperonnes du RE est plus spécifique (Egan et al. 2002).

Bien que nous ayons quelques évidences que le curcumin favorise une relocalisation à la membrane plasmique de protéines KCC3 mutées, il reste à déterminer si les co-transporteurs mutés sont fonctionnels. Pour le vérifier, il sera judicieux de pré-traiter les ovocytes de Xénope avec du curcumin avant de réaliser les études flux.

Le C-terminus pourrait permettre des interactions physiques avec des éléments du cytosquelette.

Le domaine C-terminal qui est fréquemment perdu à la suite de mutations dans le gène *KCC3* semble permettre des interactions avec des protéines dont les plus prometteuses (Vav2, MAP1B, Spectrine et Vinexine) sont des composants du cytosquelette ou des protéines chaperonnes. Ceci laisse suggérer qu'il pourrait exister un complexe multiprotéique assez conséquent qui serait perturbé par les mutations tronquantes et expliquerait l'apparition de la NSMH/ACC

Des contraintes mécaniques sur la cellule, telles que le gonflement cellulaire, font appel au cytosquelette pour que la cellule puisse résister à ces pressions et retourner à son état initial (**Figure 14**).

De plus, non seulement *KCC3* est impliquée dans la régulation du volume cellulaire, mais il a aussi été démontré que le co-transporteur participe à l'oncogenèse en promouvant la migration et l'invasion tumorale (Shen et al. 2000, Hsu et al. 2007). *KCC3* est d'ailleurs surexprimé dans certaines tumeurs ovariennes au pronostic particulièrement mauvais, ainsi que dans certains cancers du sein (Chen et al. 2010). À l'opposé, on observe

des défauts de migration axonale dans la NSMH/ACC qui sont associés à l'inactivation de KCC3. Ces deux modes de migration requièrent respectivement une dynamique importante du lamellipode et du cône de croissance – deux éléments cellulaires qui sont structurellement apparentés. La dynamique de l'un comme de l'autre nécessite une gestion étroite de l'abondant cytosquelette qui les constitue et il n'est pas impossible que l'activité de KCC3 soit dépendante de cette dynamique (**Tableau X**).

Étant donné que KCC3 est impliquée dans tous ces processus, nous avons le sentiment qu'il existe un lien étroit et peut-être même physique entre KCC3 et des protéines associées à la dynamique du cytosquelette. Le fait que nous ayons identifié des protéines telles que MAP1B, Vav2, la vinexine et la spectrine comme des partenaires potentiels semble aller dans ce sens (**Tableau VIII**).

Discussion

Les mutations dans le gène *KCC3* conduisent à des manifestations cliniques tellement différentes d'un patient à l'autre qu'un processus unique d'inactivation du co-transporteur ne permettrait pas d'expliquer cette variabilité. Il est donc possible que les différents mécanismes pathologiques identifiés dans ce travail participent à ces variations phénotypiques. Cependant, ces pathomécanismes à eux seuls n'expliquent pas tout – en particulier les différences cliniques qu'on observe chez des patients porteurs d'une même mutation dans le gène *KCC3* – et il est certain que des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux supplémentaires jouent de concert dans les fluctuations phénotypiques que l'on observe (**Tableau XI**, **Tableau E1** de l'*Article 1* et **Tableau I** de l'*Article 3*).

À la suite de ce travail, un grand nombre de partenaires d'interaction potentiels ont été identifiés (voir le chapitre de *Résultats Complémentaires*) et pour beaucoup d'entre eux il reste à déterminer si ce sont des interacteurs réels de *KCC3*. Un bon nombre d'entre eux peuvent être directement associés à la perte de fonction du co-transporteur dans la NSMH/ACC, mais il reste de nombreux aspects encore à aborder pour confirmer et mieux comprendre le rôle de ces interactions dans la manifestation de la maladie. De plus, l'identification de nouvelles mutations et de différents mécanismes pathologiques d'inactivation de *KCC3* ouvre la voie à de nouveaux modes de gestion de la maladie.

Corrélation génotype-phénotype

Le cours de la maladie a été étudié en détail chez les patients québécois, chez qui il a été observé que la NSMH/ACC se manifeste d'abord par de l'hypotonie et par un retard de développement moteur durant la première année de vie. Ainsi, les enfants affectés sont parfois capables de marcher vers l'âge de 4–6 ans, généralement avec l'aide d'un support. Cependant, l'atteinte des nerfs périphériques ne s'observe qu'à partir de l'adolescence et

résulte en une détérioration motrice sévère qui mène à une invalidité totale à l'âge adulte (**Figure 1**).

Les mutations tronquantes identifiées ici (R1011X et R1134X) donnent des phénotypes neurologiques très similaires où les réflexes et la tonicité des membres supérieurs et inférieurs sont absents. Cependant, ces mutations très distales semblent être associées à des phénotypes particulièrement sévères. En effet, tous les patients porteurs des mutations R1011X ont toujours requis au moins l'aide d'un support pour marcher et les deux individus porteurs de la mutation R1134X ne sont même jamais parvenus au stade de la marche (**Tableau E1 Article 1** et **Tableau I Article 3**). Enfin, la proportion d'individus ayant souffert d'épilepsie est 100 fois plus élevée dans ce groupe de malades (60%) que dans la population générale (0,6%) et elle même huit fois plus élevée que dans la population de malades québécois (8,4%) (Salin-Cantegrel et al. 2007). Il est donc possible que ces mutations, qui n'affectent que 2% à 12% de la séquence peptidique de *KCC3*, conduisent à des manifestations cliniques plus sévères. Mais pourquoi les mutations du gène *KCC3* augmenteraient-elles la susceptibilité aux crises d'épilepsie ?

Une explication pourrait venir du fait que les neurones qui ont perdu leur capacité à réguler leur volume sont très sensibles et particulièrement vulnérables aux changements de concentrations ioniques qui ont lieu pendant l'activité nerveuse. Cette sensibilité pourrait alors se traduire par une excitabilité nerveuse anormale. Cependant, ceci n'explique pas les différences que l'on observe entre les patients qui expriment les formes de *KCC3* peu tronquées (*e.g.* R1011X et R1134X) et ceux qui expriment les formes dépourvues du domaine C-terminal (*e.g.* T813X, mutation Canadienne-Française).

Puisque la perte d'interaction entre *KCC3* et CK-B n'est pas systématique, il se pourrait qu'il existe une relation entre l'interaction *KCC3/CK-B* et des manifestations cliniques particulières de la maladie. La fonction de CK-B est de fournir de l'énergie sous la forme d'ATP pour un grand nombre de processus cellulaires. Or, il a été proposé que l'ATP aurait un rôle dans l'initiation et la propagation des décharges épileptiformes

(Kumaria et al. 2008). De plus il a été montré chez un modèle murin qui est double KO pour CK-B et UbCKm (la créatine kinase mitochondriale), qu'il se produit un blocage des crises d'épilepsie généralisée induite par le pentylenetetrazole (Jost et al. 2002). Ces données qui établissent un lien entre CK-B et les crises d'épilepsie pourraient expliquer les manifestations plus fréquentes d'activités épileptiformes dans le système nerveux de patients porteurs de mutations tronquantes.

Une autre explication pourrait venir de la capacité d'hétéromérisation de KCC3 avec n'importe quel autre KCC (Simard et al. 2007). Il a été montré, par ailleurs, que l'altération de la fonction de KCC2 est très délétère car elle mène à une sensibilité accrue aux crises d'épilepsie (Hubner et al. 2001). Il est donc possible que l'association entre KCC3 muté et KCC2 se produise. Si l'interaction était délétère, elle pourrait résulter en un KCC2 moins fonctionnel, ce qui pourrait avoir un impact sur l'homéostasie des ions chlore et donc sur le potentiel de membrane et le niveau d'excitabilité nerveuse. Cependant, cette hypothèse sous-entend que les mutations de *KCC3* auraient un effet dominant négatif, ce qui est peu compatible avec la nature génétique de la maladie, qui est récessive et où les parents hétérozygotes n'ont aucune manifestation évidente du syndrome (Howard et al. 2002).

Il est donc probable que ce soient essentiellement des facteurs génétiques, épigénétiques ou environnementaux qui expliquent la plus forte occurrence d'épilepsie dans cette population de patients (voir plus loin dans ce chapitre de *conclusion* pour des détails).

La mutation R207C conduit aux manifestations cliniques les moins sévères parmi tous les cas identifiés à ce jour (**Tableau I** de l'*Article 3*). Il est donc possible que cette forme soit encore fonctionnelle mais que sa capacité à transiter jusqu'à la membrane plasmique soit sérieusement affectée. Peut-être qu'un nombre limité de transporteurs mutés parvient malgré tout à échapper au processus de contrôle de qualité du RE et à transiter jusqu'à la membrane plasmique des neurones. Ceci pourrait rendre ces neurones plus résistants aux variations de volume que d'autres qui n'expriment que des transporteurs

tronqués non fonctionnels. Alternativement, il est possible aussi que les formes tronquées soient bien plus néfastes que les formes non fonctionnelles mais intégrales, au point d'aggraver le phénotype *via* des mécanismes pathogéniques qu'il resterait à identifier.

Autres facteurs de variabilité phénotypique

Des variations subtiles dans l'environnement au stade fœtal mais aussi aux étapes précoces et plastiques du développement post-natal influencent l'évolution et l'apparition d'une maladie *via* des modifications épigénétiques. Ainsi, sans changer le génome en tant que tel, les modulations épigénétiques participent à l'adaptation fonctionnelle de la réponse environnementale et génomique. Les empreintes épigénétiques sont ces modifications des gènes qui sont transmissibles et réversibles mais qui ne s'accompagnent pas de changements dans la séquence nucléotidique. Elles peuvent toucher directement l'ADN (*e.g.* méthylation des cytosines) ou les protéines de modelage de l'ADN (*e.g.* acétylation des histones). Les phénomènes épigénétiques incluent les paramutations ou bookmarking, le phénomène d'empreinte, les mécanismes d'extinction de gène, l'inactivation du chromosome X, l'effet de position, la reprogrammation, la transvection, l'effet maternel (l'effet paternel est plus rare, car le sperme est un vecteur moins important de matériel non nucléotidique) et la régulation des modifications d'histone et de l'hétérochromatine. Nous ne pouvons pas exclure que ce soit du fait de tels mécanismes qu'il existe une aussi grande variabilité dans les manifestations neurologiques entre des individus porteurs de la même mutation, comme par exemple d'un patient Québécois à l'autre (Dupre et al. 2003).

Les manifestations cliniques de la NSMH/ACC sont très variables d'un patient à l'autre (**Tableau XI**). Par exemple, à partir de la même mutation (c.2436delG; mutation Québécoise), l'agénésie du corps calleux peut être nulle (33%) ou totale (58%). Il a donc été proposé que l'absence fonctionnelle de KCC3 pendant le développement rendrait les axones en migration moins résistants face à des traumatismes environnementaux (Dupre et al. 2003). Il a d'ailleurs été montré que des facteurs génétiques mais aussi environnementaux pouvaient influencer l'apparition de l'ACC (voir *paragraphe 5* du

chapitre d'*Introduction*). Il existe d'autres aspects cliniques qui pourraient être expliqués par d'autres facteurs génétiques ou des facteurs épigénétiques, tels que les variations cognitives, qui sont aussi très importantes d'un patient à l'autre. En effet, bien que la majorité des individus qui souffrent de la maladie présentent un retard mental moyen à modéré, il a été estimé que 8% des patients auraient une intelligence normale, alors que 4% auraient un retard mental sévère (Dupré et al. 2003). Enfin, les études électrophysiologiques ont aussi montré de grandes différences d'un individu à l'autre, donnant un écart entre les médianes de vitesse de conduction de nerf moteur allant jusqu'à 31m/s chez des malades âgés de 0 à 2 ans (Dupre et al. 2003).

Tableau XI.

Tableau clinique classiquement observé chez les patients NSMH/ACC québécois (d'après Durpré et al. 2003).

Aspects cliniques	<p><i>Traits dysmorphiques</i> : hypertélorisme, syndactylie des 2^{ème} et 3^{ème} orteils, brachycéphalie, palais en arc, gros orteils proéminents</p> <p><i>Fonctions cognitives</i> : retard mental sévère à moyen, épisodes psychotiques qui apparaissent durant l'adolescence</p> <p><i>Nerfs craniens</i> : ptose de la paupière, plagie faciale parfois associée à de l'atrophie hémifaciale, ésoptropie ou exotropie due à de la palsie des nerfs oculomoteurs, nystagmus horizontal</p> <p><i>Moteur</i> : progressive faiblesse des membres proximaux et distaux avec atrophie musculaire – le bébé est hypotonique dans la première année de vie puis apprend à marcher entre 2–5 ans et termine en fauteuil roulant, tremblements des membres</p> <p><i>Réflexes</i> : absents dès la naissance</p> <p><i>Sensoriel</i> : toutes les modalités sont modérément à sévèrement affectées dès la naissance</p> <p><i>Autre</i> : scoliose, syndrome respiratoire restrictif, épilepsie</p>
Investigations	<p><i>Ponction lombaire</i> : élévation moyenne des protéines</p> <p><i>Conduction nerveuse et EMG chez les jeunes enfants</i> : potentiel sensoriel absent, vitesse variable de la conduction nerveuse motrice, fibrillations</p> <p><i>EEG</i> : Généralement normal</p> <p><i>Imagerie</i> : ACC, ACC partielle ou pas ACC, parfois atrophie corticale ou cérébelleuse modérée chez les patients plus âgés</p> <p><i>Biopsies du nerf sphère externe</i> : pas de fibres myélinisées, signes de perte axonale (dégénérescence Wallerienne) et axones élargis avec une diminution de la densité en neurofilaments</p> <p><i>Biopsie de muscle</i> : signes non-spécifiques de dénervation chronique, atrophie</p>
Autopsies	<p><i>Gonflement axonal</i> : Observé au niveau des nerfs craniens, des racines nerveuses dorsales et ventrales, dispersé dans la matière blanche</p> <p><i>ACC</i> : absent, partiel ou total avec préservation des faisceaux de Probst</p>

ACC : agénésie du corps calleux; EMG : électromyogramme; EEG : électroencéphalogramme

Aller vers une meilleure compréhension de la relation structure-fonction de KCC3

Au cours de ce projet nous avons fait avancer la connaissance sur la relation structure-fonction de KCC3. Cependant pour établir une carte encore plus précise de cette relation structure-fonction du C-terminus, il est nécessaire de poursuivre l'identification des domaines fonctionnels du co-transporteur; comme par exemple quels sont les résidus qui influent des propriétés intrinsèques telles que la sensibilité à la tonicité ou le transit intracellulaire de KCC3. Pour identifier ces domaines fonctionnels, nous proposons de faire les mutagenèses dirigées qui cibleraient des résidus suspectés d'être importants pour ces fonctions (voir la liste du **Tableau VI**). Cette approche réalisée avec succès par Rinhart et al en 2009 a mené à l'identification de résidus Serine et Thréonine C-terminaux dont la phosphorylation influence fortement la réponse de KCC3 aux conditions hypotoniques (**Figure 15**). Ce même type d'approche nous a permis aussi de montrer l'importance fonctionnelle de la séquence PR (**Figure 7**).

L'identification de nouveaux partenaires physiques de KCC3 pourrait aussi nécessiter l'isolation individuelle des motifs ou domaines d'interaction protéine-protéine du co-transporteur. Afin d'y parvenir, une méthode préalable à la mutagenèse dirigée consisterait à réaliser la dichotomie du C-terminus en produisant des fragments de plus en plus petits jusqu'à obtenir une région minimale d'interaction pour chacun des nouveaux partenaire. Par la suite il faudra confirmer l'importance fonctionnelle de ces interactions. Pour se faire, nous pourrions à nouveau tester l'impact fonctionnel des partenaires sur la fonction de KCC3 par des études de flux dans les ovocytes de Xénope en ayant recours à des inhibiteurs spécifiques ou des dominants négatifs.

Dans un autre registre, une mutation naturelle faux-sens qui affecte la Glu⁵³⁹ a récemment été identifiée. Le résidu muté (localisé dans le 7^{ième} domaine transmembranaire de KCC3) se trouve dans une portion de la protéine suspectée d'être directement impliquée dans l'affinité aux ions Cl⁻. C'est pourquoi l'analyse fonctionnelle de mutant naturel tels que le G539D permettra de déterminer l'importance de certains résidus pour la fonction de KCC3 mais aussi de raffiner la relation structure-fonction des CCCs.

Aller vers une meilleure gestion de la maladie

Avancée diagnostique

La découverte de nouvelles mutations dans le gène responsable de la NSMH/ACC devrait permettre un diagnostic moléculaire plus rapide de la maladie. La faible fréquence de la maladie hors de la région du Saguenay Lac-St-Jean et le comté de Charlevoix et la complexité du profil clinique font qu'il n'est pas évident pour un neurologue qui n'a jamais eu à traiter un patient souffrant de la NSMH/ACC de le diagnostiquer du premier coup d'oeil. Cependant, l'identification de la mutation 3036C→T dispersée sur trois continents (Afrique, Asie et Europe) devrait permettre de diagnostiquer plus efficacement la maladie dans ces régions (voir *Article 1*).

Une meilleure corrélation génotype-phénotype devrait permettre aussi une meilleure prise en charge de la maladie. Étant donné que l'impact de certaines mutations semble être lié leur nature, la détection précoce de variant particulier pourrait améliorer dans l'avenir la prise en charge des patients. Par exemple, si il est confirmé que les mutations T3036C→T et 3402C→T sont effectivement associées à des formes plus sévères, une gestion plus lourde des malades, y compris un suivi anticipé de l'épilepsie, sera à envisager pour les patients porteurs de ces deux types de mutations.

Avancée thérapeutique

Nos efforts sont aussi orientés vers la sélection de traitements et de voies thérapeutiques qui permettront de circonvenir les anomalies majeures qui affectent la fonction des KCC3 mutées. Il va de soit que si de nouvelles approches thérapeutique sont envisagées, elles devront d'abord être validées sur des modèles cellulaires et dans un modèle murins pour la maladie bien avant qu'il puisse être proposé de les mettre en pratique chez les patients NSMH/ACC.

Nous avons constaté que certaines mutations NSMH/ACC conduisent à des difficultés au niveau du transit de la protéine mutée vers la membrane plasmique en raison d'une rétention intracellulaire. Il existe des traitements qui permettraient de corriger ce type de phénomène et ses probables effets délétères. Par exemple, il a été suggéré qu'une alimentation riche en curcumin serait efficace pour réduire certaines manifestations de neuropathies périphériques héréditaires (*e.g.* certains type de CMT), en réduisant la rétention intracellulaire des protéines mutées (Carter et al. 2008). De manière similaire, nous avons des résultats très encourageants qui montrent qu'un tel traitement réduit fortement l'accumulation intracellulaire aberrante des KCC3 mutées (voir l'*Article 3*). Mis à part le curcumin, il existe d'autres molécules qui corrigent la rétention de protéines maintenue dans le réticulum endoplasmique. Cependant, ce sont généralement des composés chimiques qui inhibent l'activité des pompes calcium du RE et qui de ce fait jouent sur l'activité des protéines chaperonnes (Egan et al. 2002). Il serait intéressant de déterminer si l'administration de ces composés pourrait soulager de certains symptômes de la maladie, en particulier les individus porteurs de mutations qui mènent à la perturbation du transit intracellulaire de KCC3.

Nous pourrions aussi administrer des doses non toxiques d'antibiotiques aminoglycoside (gentamicin/thioguanine/ofloxacin; composés chimiques médicamenteux) dans le but de passer outre les mutations 'stop' dans le gène KCC3. Les aminoglycosides font l'objet de beaucoup d'attention pour le traitement d'autres maladies, comme le syndrome de Hurler, la myopathie de Duchenne et la fibrose kystique. Ces traitements

pourraient aider à diminuer l'instabilité de KCC3 mutée, à restituer –partiellement si ce n'est totalement – la fonction de la protéine mutée et à favoriser son transit jusqu'à la membrane plasmique.

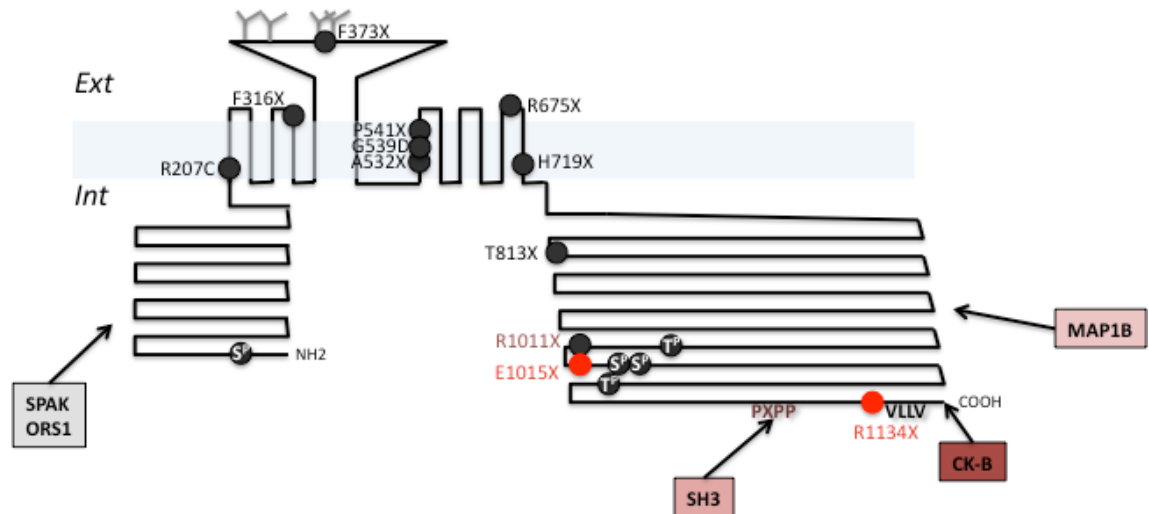
La grande majorité des patients sont des Québécois porteurs de la mutation T813X qui mène à l'élimination de la quasi-totalité du domaine C-terminal. Dans ce contexte, l'altération est telle qu'il est très probable que l'administration d'agents thérapeutiques qui viseraient à stimuler la fonction de KCC3 muté n'aurait aucun succès. Cependant, nous pourrions amplifier la fonction d'autres KCCs qui sont moins exprimés dans le système nerveux mais qui y sont naturellement présents (KCC1 et KCC4) à l'aide d'agents chimiques tels que N-éthylmaléimique (NEM) qui est capable de stimuler la fonction des KCCs fonctionnels même en l'absence de conditions hypotonique. Enfin, nous n'excluons pas d'envisager des approches de manipulation génétique qui consisteraient à compléter la fonction de KCC3, soit avec un gène KCC3 sauvage transduit par infection viral. Ceci permettrait alors de restituer l'expression d'une protéine intégrale dans les tissus déficients.

Conclusion générale

Au cours de ce projet nous avons parvenu à une meilleure caractérisation structurale et fonctionnelle du co-transporteur KCC3. Nous avons de plus répertorié deux nouvelles mutations qui causent la NSMH/ACC, ce qui amène à un total de 12 mutations causales (**Figure 15** et **Tableau 1** de l'*Article 4*)

Figure 15

Mutations identifiées et partenaires d'interaction directe de KCC3 suspectés en fin de projet



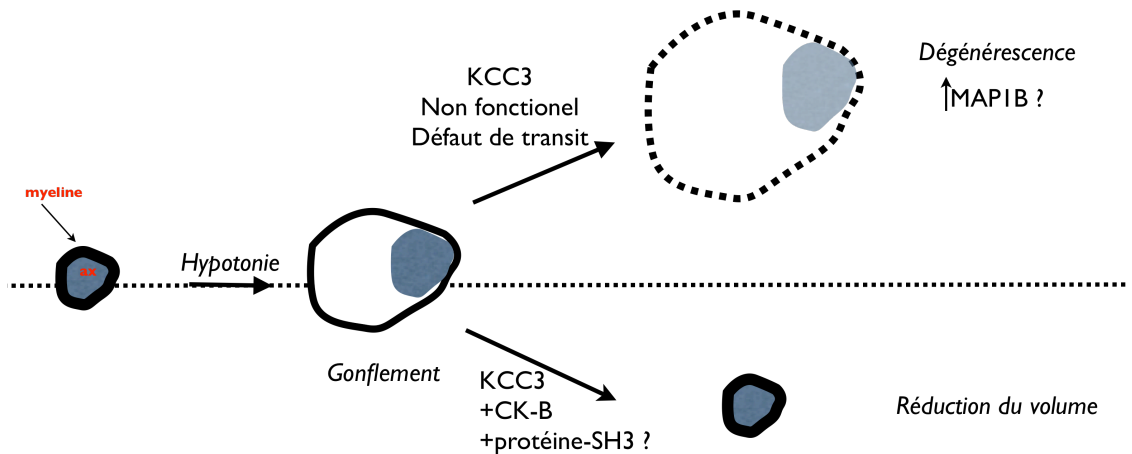
Toutes les protéines mutées connues à ce jour sont indiquées et les mutants nouvellement caractérisés sont signalés en rouge. Les partenaires d'interaction physique ainsi que les résidus fonctionnels sont également signalés.

De plus, les résultats obtenus au cours de cette thèse nous ont permis de proposer les mécanismes résumés dans la **Figure 16**. Nous avons établi que la kinase CK-B module l'activité de KCC3 par l'intermédiaire d'une interaction directe avec le domaine C-terminal du co-transporteur et nous savons désormais que l'assemblage dimérique de KCC3 et son adressage à la membrane est une étape charnière pour la fonction du co-transporteur. Enfin, des travaux complémentaires sont en cours au laboratoire afin de déterminer si les nouvelles interactions putatives, que nous venons d'identifier, participent bien à la pathogenèse de la NSMH/ACC.

Figure 16.

Mécanismes qui mènent à des défauts de régulation du volume axonal dans la NSMH/ACC.

Pathologie



Normal

Bibliographie

- Allen, E., Ding, J., Wang, W., Pramanik, S., Chou, J., Yau, V., et al. (2005). Gigaxonin-controlled degradation of MAP1B light chain is critical to neuronal survival. *Nature*, 438(7065), 224-228.
- Alvarez-Leefmans FJ, León-Olea M, Mendoza-Sotelo J, Alvarez FJ, Antón B, Garduño R (2001). Immunolocalization of the Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in peripheral nervous tissue of vertebrates. *Neuroscience*, 104(2):569-82.
- Andermann, E. (1981). Sensorimotor neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Handbook of clinical neurology*, 42 (Ed Vinken PJ).
- Andermann, E. e. a. (1979). Familial agenesis of the corpus callosum with sensorimotor neuropathy: Genetic and epidemiological studies of over 170 patients. *Can J Neurol Sci*, 6, 400.
- Andermann, F., Andermann, E & Joubert, M. (1972). Familial agenesis of the corpus callosum with anterior horn cell disease: a syndrome of mental retardation, areflexia and paraparesis. *Trans Am Neurol Assoc*, 1972, 242-244.
- Barfod, E. T., Moore, A. L., Melnick, R. F., & Lidofsky, S. D. (2005). Src regulates distinct pathways for cell volume control through Vav and phospholipase Cgamma. *J Biol Chem*, 280(27), 25548-25557.
- Benstead, T. J., & Grant, I. A. (2001). Progress in clinical neurosciences: Charcot-Marie-Tooth disease and related inherited peripheral neuropathies. *Can J Neurol Sci*, 28(3), 199-214.
- Berger, P., Young, P., & Suter, U. (2002). Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics*, 4(1), 1-15.
- Bergeron, M. J., Gagnon, E., Caron, L., & Isenring, P. (2006). Identification of key functional domains in the C terminus of the K⁺-Cl⁻ cotransporters. *J Biol Chem*, 281(23), 15959-15969.
- Birouk, N., Gouider, R., Le Guern, E., Gugenheim, M., Tardieu, S., Maisonobe, T., et al. (1997). Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases.

Brain, 120 (Pt 5), 813-823.

- Boerkoel, C. F., Takashima, H., Stankiewicz, P., Garcia, C. A., Leber, S. M., Rhee-Morris, L., et al. (2001). Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet*, 68(2), 325-333.
- Boettger, T., Hubner, C. A., Maier, H., Rust, M. B., Beck, F. X., & Jentsch, T. J. (2002). Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter *Kcc4*. *Nature*, 416(6883), 874-878.
- Boettger, T., Rust, M. B., Maier, H., Seidenbecher, T., Schweizer, M., Keating, D. J., et al. (2003). Loss of K-Cl co-transporter *KCC3* causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *EMBO J*, 22(20), 5422-5434.
- Bolino, A., Muglia, M., Conforti, F. L., LeGuern, E., Salih, M. A., Georgiou, D. M., et al. (2000). Charcot-Marie-Tooth type 4B is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet*, 25(1), 17-19.
- Bomont, P., Cavalier, L., Blondeau, F., Ben Hamida, C., Belal, S., Tazir, M., et al. (2000). The gene encoding gigaxonin, a new member of the cytoskeletal BTB/kelch repeat family, is mutated in giant axonal neuropathy. *Nat Genet*, 26(3), 370-374.
- Bouquet, C., Soares, S., von Boxberg, Y., Ravaille-Veron, M., Propst, F., & Nothias, F. (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci*, 24(32), 7204-7213.
- Briancon-Marjollet, A., Ghogha, A., Nawabi, H., Triki, I., Auziol, C., Fromont, S., et al. (2008). Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol*, 28(7), 2314-2323.
- Byun, N., & Delpire, E. (2007). Axonal and periaxonal swelling precede peripheral neurodegeneration in *KCC3* knockout mice. *Neurobiol Dis*, 28(1), 39-51.
- Caron, L., Rousseau, F., Gagnon, E., & Isenring, P. (2000). Cloning and functional characterization of a cation-Cl⁻ cotransporter-interacting protein. *J Biol Chem*, 275(41), 32027-32036.

- Carter, G. T., Weiss, M. D., Han, J. J., Chance, P. F., & England, J. D. (2008). Charcot-marie-tooth disease. *Curr Treat Options Neurol*, 10(2), 94-102.
- Casula, S., Zolotarev, A. S., Stuart-Tilley, A. K., Wilhelm, S., Shmukler, B. E., Brugnara, C., et al. (2009). Chemical crosslinking studies with the mouse *Kcc1* K-Cl cotransporter. *Blood Cells Mol Dis*, 42(3), 233-240.
- Chance, P. F. (2000). Hereditary neuropathy. *Neurogenetics*, 57(ed. Pulst, S.M.), 61-75.
- Chang, H., Tashiro, K., Hirai, M., Ikeda, K., Kurokawa, K., & Fujita, T. (1996). Identification of a cDNA encoding a thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter from the human and its mRNA expression in various tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 223(2), 324-328.
- Chapon, F., Latour, P., Diraison, P., Schaeffer, S., & Vandenberghe, A. (1999). Axonal phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease associated with a mutation in the myelin protein zero gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66(6), 779-782.
- Chen YF, Chou CY, Ellory JC, Shen MR. (2010). The emerging role of KCl cotransport in tumor biology. *Am J Transl Res*, 2(4):345-55.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., et al. (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet*, 30(1), 22-25.
- Daigle, N. D., Carpentier, G. A., Frenette-Cotton, R., Simard, M. G., Lefoll, M. H., Noel, M., et al. (2009). Molecular characterization of a human cation-Cl⁻ cotransporter (SLC12A8A, CCC9A) that promotes polyamine and amino acid transport. *J Cell Physiol*, 220(3), 680-689.
- Davies, S. L., Roussa, E., Le Rouzic, P., Thevenod, F., Alper, S. L., Best, L., et al. (2004). Expression of K⁺-Cl⁻ cotransporters in the alpha-cells of rat endocrine pancreas. *Biochim Biophys Acta*, 1667(1), 7-14.
- De Braekeleer, M., Dallaire, A., & Mathieu, J. (1993). Genetic epidemiology of sensorimotor polyneuropathy with or without agenesis of the corpus callosum in northeastern Quebec. *Hum Genet*, 91(3), 223-227.
- de Los Heros, P., Kahle, K. T., Rinehart, J., Bobadilla, N. A., Vazquez, N., San Cristobal, P., et al.

- (2006). WNK3 bypasses the tonicity requirement for K-Cl cotransporter activation via a phosphatase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(6), 1976-1981.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J. M., Tazir, M., Kassouri, N., et al. (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet*, 70(3), 726-736.
- Delpire, E., Lu, J., England, R., Dull, C., & Thorne, T. (1999). Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet*, 22(2), 192-195.
- Delpire E, Mount DB (2002). Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol*. 2002;64:803-43.
- Dixon, M. J., Gazzard, J., Chaudhry, S. S., Sampson, N., Schulte, B. A., & Steel, K. P. (1999). Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene Slc12a2 results in deafness in mice. *Hum Mol Genet*, 8(8), 1579-1584.
- Dobyns, W. B., Andermann, E., Andermann, F., Czapansky-Beilman, D., Dubeau, F., Dulac, O., et al. (1996). X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology*, 47(2), 331-339.
- Dupre, N., Howard, H. C., Mathieu, J., Karpati, G., Vanasse, M., Bouchard, J. P., et al. (2003). Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol*, 54(1), 9-18.
- Dyck, P. J. (1982). Current concepts in neurology. The causes, classification, and treatment of peripheral neuropathy. *N Engl J Med*, 307(5), 283-286.
- Dzhala, V. I., Talos, D. M., Sdrulla, D. A., Brumback, A. C., Mathews, G. C., Benke, T. A., et al. (2005). NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med*, 11(11), 1205-1213.
- Egan ME, Glöckner-Pagel J, Ambrose C, Cahill PA, Pappoe L, Balamuth N, Cho E, et al. (2002). Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med*. 8(5):485-92.
- Elmslie, F. V., Rees, M., Williamson, M. P., Kerr, M., Kjeldsen, M. J., Pang, K. A., et al. (1997). Genetic mapping of a major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on

- chromosome 15q. *Hum Mol Genet*, 6(8), 1329-1334.
- Evans, R. L., Park, K., Turner, R. J., Watson, G. E., Nguyen, H. V., Dennett, M. R., et al. (2000). Severe impairment of salivation in Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem*, 275(35), 26720-26726.
- Filteau, M. J., Pourcher, E., Bouchard, R. H., Baruch, P., Mathieu, J., Bedard, F., et al. (1991). Corpus callosum agenesis and psychosis in Andermann syndrome. *Arch Neurol*, 48(12), 1275-1280.
- Freedman, R. (2007). Neuronal dysfunction and schizophrenia symptoms. *Am J Psychiatry*, 164(3), 385-390.
- Galanopoulou AS. (2010) Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy. *Pflugers Arch*. 460(2):505-23.
- Gamba, G. (2005). Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol Rev*, 85(2), 423-493.
- Gamba, G., Saltzberg, S. N., Lombardi, M., Miyanoshita, A., Lytton, J., Hediger, M. A., et al. (1993). Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(7), 2749-2753.
- Garzon-Muvdi, T., Pacheco-Alvarez, D., Gagnon, K. B., Vazquez, N., Ponce-Coria, J., Moreno, E., et al. (2007). WNK4 kinase is a negative regulator of K⁺-Cl⁻ cotransporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292(4), F1197-1207.
- Gasser HS, The Classification of Nerve Fibers. Creators: Gasser, Herbert S. Issue Date: May-1941. Citation: *The Ohio Journal of Science*. v41 n3 (May, 1941), 145-159
- Gejman, P. V., Sanders, A. R., Badner, J. A., Cao, Q., & Zhang, J. (2001). Linkage analysis of schizophrenia to chromosome 15. *Am J Med Genet*, 105(8), 789-793.
- Gillen, C. M., Brill, S., Payne, J. A., & Forbush, B., 3rd. (1996). Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem*, 271(27), 16237-16244.
- Haas, M., & Forbush, B., 3rd. (1998). The Na-K-Cl cotransporters. *J Bioenerg Biomembr*, 30(2),

161-172.

- Hansen, J. J., Durr, A., Cournu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M. N., et al. (2002). Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60. *Am J Hum Genet*, *70*(5), 1328-1332.
- Hauser, E., Bittner, R., Liegl, C., Bernert, G., & Zeitlhofer, J. (1993). Occurrence of Andermann syndrome out of French Canada--agenesis of the corpus callosum with neuronopathy. *Neuropediatrics*, *24*(2), 107-110.
- Hiki, K., D'Andrea, R. J., Furze, J., Crawford, J., Woollatt, E., Sutherland, G. R., et al. (1999). Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem*, *274*(15), 10661-10667.
- Howard, H. C., Mount, D. B., Rochefort, D., Byun, N., Dupre, N., Lu, J., et al. (2002). The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet*, *32*(3), 384-392.
- Hsu, Y. M., Chen, Y. F., Chou, C. Y., Tang, M. J., Chen, J. H., Wilkins, R. J., et al. (2007). KCl cotransporter-3 down-regulates E-cadherin/beta-catenin complex to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, *67*(22), 11064-11073.
- Hsu, Y. M., Chou, C. Y., Chen, H. H., Lee, W. Y., Chen, Y. F., Lin, P. W., et al. (2007). IGF-1 upregulates electroneutral K-Cl cotransporter KCC3 and KCC4 which are differentially required for breast cancer cell proliferation and invasiveness. *J Cell Physiol*, *210*(3), 626-636.
- Hubner, C. A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., & Jentsch, T. J. (2001). Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, *30*(2), 515-524.
- Huffmeier, U., Lascorz, J., Traupe, H., Bohm, B., Schurmeier-Horst, F., Stander, M., et al. (2005). Systematic linkage disequilibrium analysis of SLC12A8 at PSORS5 confirms a role in susceptibility to psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol*, *125*(5), 906-912.
- Hughes, R. A. (2002). Peripheral neuropathy. *BMJ*, *324*(7335), 466-469.
- Inoue, K., Yamada, J., Ueno, S., & Fukuda, A. (2006). Brain-type creatine kinase activates neuron-

- specific K⁺-Cl⁻ co-transporter KCC2. *J Neurochem*, 96(2), 598-608.
- Jiao, Y., Jin, X., Yan, J., Zhang, C., Jiao, F., Li, X., et al. (2008). A deletion mutation in Slc12a6 is associated with neuromuscular disease in gaxp mice. *Genomics*, 91(5), 407-414.
- Jost CR, Van Der Zee CE, In 't Zandt HJ, Oerlemans F, Verheij M, Streijger F, Fransen J, Heerschap A, Cools AR, Wieringa B. (2002) Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. *Eur J Neurosci*, 15(10):1692-706.
- Kahle, K. T., Rinehart, J., de Los Heros, P., Louvi, A., Meade, P., Vazquez, N., et al. (2005). WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(46), 16783-16788.
- Kakazu, Y., Akaike, N., Komiyama, S., & Nabekura, J. (1999). Regulation of intracellular chloride by cotransporters in developing lateral superior olive neurons. *J Neurosci*, 19(8), 2843-2851.
- Kassai, H., Terashima, T., Fukaya, M., Nakao, K., Sakahara, M., Watanabe, M., et al. (2008). Rac1 in cortical projection neurons is selectively required for midline crossing of commissural axonal formation. *Eur J Neurosci*, 28(2), 257-267.
- Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S. K., Okazaki, K., et al. (1999). Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol*, 144(1), 59-69.
- Kleopa, K. A., Yum, S. W., & Scherer, S. S. (2002). Cellular mechanisms of connexin32 mutations associated with CNS manifestations. *J Neurosci Res*, 68(5), 522-534.
- Kuhlenbaumer, G., Young, P., Oberwittler, C., Hunermund, G., Schirmacher, A., Domschke, K., et al. (2002). Giant axonal neuropathy (GAN): case report and two novel mutations in the gigaxonin gene. *Neurology*, 58(8), 1273-1276.
- Kumaria A, Tolia CM, Burnstock G. (2008) ATP signalling in epilepsy. *Purinergic Signal*. 4(4):339-46.
- Kunchaparty, S., Palcsó, M., Berkman, J., Velázquez, H., Desir, G. V., Bernstein, P., et al. (1999). Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of

- Gitelman's syndrome. *Am J Physiol*, 277(4 Pt 2), F643-649.
- Larbrisseau, A., Vanasse, M., Brochu, P., & Jasmin, G. (1984). The Andermann syndrome: agenesis of the corpus callosum associated with mental retardation and progressive sensorimotor neuronopathy. *Can J Neurol Sci*, 11(2), 257-261.
- Lauf, P. K., & Adragna, N. C. (1996). A thermodynamic study of electroneutral K-Cl cotransport in pH- and volume-clamped low K sheep erythrocytes with normal and low internal magnesium. *J Gen Physiol*, 108(4), 341-350.
- Lauf, P. K., & Adragna, N. C. (2000). K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism. *Cell Physiol Biochem*, 10(5-6), 341-354.
- Lauf, P. K., Zhang, J., Delpire, E., Fyffe, R. E., Mount, D. B., & Adragna, N. C. (2001). K-Cl cotransport: immunocytochemical and functional evidence for more than one KCC isoform in high K and low K sheep erythrocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130(3), 499-509.
- Le Rouzic, P., Ivanov, T. R., Stanley, P. J., Baudoin, F. M., Chan, F., Pinteaux, E., et al. (2006). KCC3 and KCC4 expression in rat adult forebrain. *Brain Res*, 1110(1), 39-45.
- Leblanc, G., Mortezaei, M., & Popez-Pinto, C. (1966). Agénésie du corps calleux (12 cas). *Neurochirurgie*, 7(789).
- Leiserson, W. M., Harkins, E. W., & Keshishian, H. (2000). Fray, a Drosophila serine/threonine kinase homologous to mammalian PASK, is required for axonal ensheathment. *Neuron*, 28(3), 793-806.
- Li, H., Tornberg, J., Kaila, K., Airaksinen, M. S., & Rivera, C. (2002). Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *Eur J Neurosci*, 16(12), 2358-2370.
- Lorenzetti, D., Pareyson, D., Sghirlanzoni, A., Roa, B. B., Abbas, N. E., Pandolfo, M., et al. (1995). A 1.5-Mb deletion in 17p11.2-p12 is frequently observed in Italian families with hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Am J Hum Genet*, 56(1), 91-98.
- Magen, D., Georgopoulos, C., Bross, P., Ang, D., Segev, Y., Goldsher, D., et al. (2008). Mitochondrial hsp60 chaperonopathy causes an autosomal-recessive neurodegenerative

- disorder linked to brain hypomyelination and leukodystrophy. *Am J Hum Genet*, 83(1), 30-42.
- Mahadevan, A., Santosh, V., Gayatri, N., Ratnavalli, E., NandaGopal, R., Vasanth, A., et al. (2000). Infantile neuroaxonal dystrophy and giant axonal neuropathy--overlap diseases of neuronal cytoskeletal elements in childhood? *Clin Neuropathol*, 19(5), 221-229.
- Mathieu, J., Bedard, F., Prevost, C., & Langevin, P. (1990). [Motor and sensory neuropathies with or without agenesis of the corpus callosum: a radiological study of 64 cases.]. *Can J Neurol Sci*, 17(2), 103-108.
- Matthews, P. M., Ford, B., Dandurand, R. J., Eidelman, D. H., O'Connor, D., Sherwin, A., et al. (1993). Coenzyme Q10 with multiple vitamins is generally ineffective in treatment of mitochondrial disease. *Neurology*, 43(5), 884-890.
- Meixner, A., Haverkamp, S., Wassle, H., Fuhrer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., et al. (2000). MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol*, 151(6), 1169-1178.
- Mercado, A., Vazquez, N., Song, L., Cortes, R., Enck, A. H., Welch, R., et al. (2005). NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(6), F1246-1261.
- Meyer, J., Johannssen, K., Freitag, C. M., Schraut, K., Teuber, I., Hahner, A., et al. (2005). Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8(4), 495-504.
- Meyer, J., Ortega, G., Schraut, K., Nurnberg, G., Ruschendorf, F., Saar, K., et al. (2002). Exclusion of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene as a candidate for catatonic schizophrenia in a large family supporting the chromosome 15q13-22 locus. *Mol Psychiatry*, 7(2), 220-223.
- Mizutani, K., Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., Deguchi, T., Nozawa, Y., et al. (2007). Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of vinexin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth. *Oncogene*, 26(50), 7122-7131.
- Morton, C. J., & Campbell, I. D. (1994). SH3 domains. Molecular 'Velcro'. *Curr Biol*, 4(7), 615-

617.

- Moser, D., Ekawardhani, S., Kumsta, R., Palmason, H., Bock, C., Athanassiadou, Z., et al. (2009). Functional analysis of a potassium-chloride co-transporter 3 (SLC12A6) promoter polymorphism leading to an additional DNA methylation site. *Neuropsychopharmacology*, *34*(2), 458-467.
- Mosior, M., Bobrowska, M., & Gomulkiewicz, J. (1990). Effect of the level of ATP and of the state of spectrin on osmotic properties of bovine erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, *1022*(3), 355-360.
- Mount, D. B., Delpire, E., Gamba, G., Hall, A. E., Poch, E., Hoover, R. S., et al. (1998). The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J Exp Biol*, *201*(Pt 14), 2091-2102.
- Mount, D. B., Mercado, A., Song, L., Xu, J., George, A. L., Jr., Delpire, E., et al. (1999). Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem*, *274*(23), 16355-16362.
- Munoz, A., Mendez, P., DeFelipe, J., & Alvarez-Leefmans, F. J. (2007). Cation-chloride cotransporters and GABA-ergic innervation in the human epileptic hippocampus. *Epilepsia*, *48*(4), 663-673.
- Naiman, J., & Fraser, F. C. (1955). Agenesis of the corpus callosum; a report of two cases in sibs. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, *74*(2), 182-185.
- Nakajima, K., Miyazaki, H., Niisato, N., & Marunaka, Y. (2007). Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun*, *359*(3), 604-610.
- Nelis, E., Haites, N., & Van Broeckhoven, C. (1999). Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat*, *13*(1), 11-28.
- Neubauer, B. A., Fiedler, B., Himmelein, B., Kampfer, F., Lassker, U., Schwabe, G., et al. (1998). Centrotemporal spikes in families with rolandic epilepsy: linkage to chromosome 15q14. *Neurology*, *51*(6), 1608-1612.
- Nguyen, M., Pace, A. J., & Koller, B. H. (2007). Mice lacking NKCC1 are protected from development of bacteremia and hypothermic sepsis secondary to bacterial pneumonia. *J Exp Med*, *204*(6), 1383-1393.

- Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., & Morishima, S. (2001). Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*, 532(Pt 1), 3-16.
- Orlov, S. N., Kolosova, I. A., Cragoe, E. J., Gurlo, T. G., Mongin, A. A., Aksentsev, S. L., et al. (1993). Kinetics and peculiarities of thermal inactivation of volume-induced Na⁺/H⁺ exchange, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransport and K⁺,Cl⁻ cotransport in rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1151(2), 186-192.
- Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*, 3(9), 715-727.
- Pathak, B. G., Shaughnessy, J. D., Jr., Meneton, P., Greeb, J., Shull, G. E., Jenkins, N. A., et al. (1996). Mouse chromosomal location of three epithelial sodium channel subunit genes and an apical sodium chloride cotransporter gene. *Genomics*, 33(1), 124-127.
- Payne, J. A., & Forbush, B., 3rd. (1995). Molecular characterization of the epithelial Na-K-Cl cotransporter isoforms. *Curr Opin Cell Biol*, 7(4), 493-503.
- Payne, J. A., Stevenson, T. J., & Donaldson, L. F. (1996). Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J Biol Chem*, 271(27), 16245-16252.
- Pearson, M. M., Lu, J., Mount, D. B., & Delpire, E. (2001). Localization of the K(+)-Cl(-) cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: expression in the choroid plexus, large neurons and white matter tracts. *Neuroscience*, 103(2), 481-491.
- Phillips, J. P., Warner, L. E., Lupski, J. R., & Garg, B. P. (1999). Congenital hypomyelinating neuropathy: two patients with long-term follow-up. *Pediatr Neurol*, 20(3), 226-232.
- Piechotta, K., Lu, J., & Delpire, E. (2002). Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *J Biol Chem*, 277(52), 50812-50819.
- Quaggin, S. E., Payne, J. A., Forbush, B., 3rd, & Igarashi, P. (1995). Localization of the renal Na-K-Cl cotransporter gene (Slc12a1) on mouse chromosome 2. *Mamm Genome*, 6(8), 557-558.

- Race, J. E., Makhlouf, F. N., Logue, P. J., Wilson, F. H., Dunham, P. B., & Holtzman, E. J. (1999). Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol*, 277(6 Pt 1), C1210-1219.
- Rinehart, J., Maksimova, Y. D., Tanis, J. E., Stone, K. L., Hodson, C. A., Zhang, J., et al. (2009). Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell*, 138(3), 525-536.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., et al. (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397(6716), 251-255.
- Rudnik-Schoneborn, S., Hehr, U., von Kalle, T., Bornemann, A., Winkler, J., & Zerres, K. (2009). Andermann syndrome can be a phenocopy of hereditary motor and sensory neuropathy-- report of a discordant sibship with a compound heterozygous mutation of the KCC3 gene. *Neuropediatrics*, 40(3), 129-133.
- Rust, M. B., Alper, S. L., Rudhard, Y., Shmukler, B. E., Vicente, R., Brugnara, C., et al. (2007). Disruption of erythroid K-Cl cotransporters alters erythrocyte volume and partially rescues erythrocyte dehydration in SAD mice. *J Clin Invest*, 117(6), 1708-1717.
- Rust, M. B., Faulhaber, J., Budack, M. K., Pfeffer, C., Maritzen, T., Didie, M., et al. (2006). Neurogenic mechanisms contribute to hypertension in mice with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3. *Circ Res*, 98(4), 549-556.
- Sachs, J. R., & Martin, D. W. (1999). Role of polyamine structure in inhibition of K⁺-Cl⁻ cotransport in human red cell ghosts. *J Physiol*, 520 Pt 3, 723-735.
- Salin-Cantegrel, A., Riviere, J. B., Dupre, N., Charron, F. M., Shekarabi, M., Karemera, L., et al. (2007). Distal truncation of KCC3 in non-French Canadian HMSN/ACC families. *Neurology*, 69(13), 1350-1355.
- Salin-Cantegrel, A., Shekarabi, M., Holbert, S., Dion, P., Rochefort, D., Laganiere, J., et al. (2008). HMSN/ACC truncation mutations disrupt brain-type creatine kinase-dependant activation of K⁺/Cl⁻ co-transporter 3. *Hum Mol Genet*, 17(17), 2703-2711.
- Schmid, R. S., Midkiff, B. R., Kedar, V. P., & Maness, P. F. (2004). Adhesion molecule L1

- stimulates neuronal migration through Vav2-Pak1 signaling. *Neuroreport*, 15(18), 2791-2794.
- Schultheis, P. J., Lorenz, J. N., Meneton, P., Nieman, M. L., Riddle, T. M., Flagella, M., et al. (1998). Phenotype resembling Gitelman's syndrome in mice lacking the apical Na⁺-Cl⁻ cotransporter of the distal convoluted tubule. *J Biol Chem*, 273(44), 29150-29155.
- Schell-Apacik, C. C., Wagner, K., Bihler, M., Ertl-Wagner, B., Heinrich, U., Klopocki, E., et al. (2008). Agenesis and dysgenesis of the corpus callosum: clinical, genetic and neuroimaging findings in a series of 41 patients. *Am J Med Genet A*, 146A(19), 2501-2511.
- Shen, M. R., Chou, C. Y., & Ellory, J. C. (2000). Volume-sensitive KCl cotransport associated with human cervical carcinogenesis. *Pflugers Arch*, 440(5), 751-760.
- Shen, M. R., Chou, C. Y., Hsu, K. F., Liu, H. S., Dunham, P. B., Holtzman, E. J., et al. (2001). The KCl cotransporter isoform KCC3 can play an important role in cell growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25), 14714-14719.
- Simard, C. F., Bergeron, M. J., Frenette-Cotton, R., Carpentier, G. A., Pelchat, M. E., Caron, L., et al. (2007). Homooligomeric and heterooligomeric associations between K⁺-Cl⁻ cotransporter isoforms and between K⁺-Cl⁻ and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters. *J Biol Chem*, 282(25), 18083-18093.
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A., & Lifton, R. P. (1996). Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*, 13(2), 183-188.
- Simon, D. B., Nelson-Williams, C., Bia, M. J., Ellison, D., Karet, F. E., Molina, A. M., et al. (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet*, 12(1), 24-30.
- Starremans, P. G., Kersten, F. F., Van Den Heuvel, L. P., Knoers, N. V., & Bindels, R. J. (2003). Dimeric architecture of the human bumetanide-sensitive Na-K-Cl Co-transporter. *J Am Soc Nephrol*, 14(12), 3039-3046.
- Stein, V., & Nicoll, R. A. (2003). GABA generates excitement. *Neuron*, 37(3), 375-378.
- Steinlein, O. K., Neubauer, B. A., Sander, T., Song, L., Stoodt, J., & Mount, D. B. (2001).

- Mutation analysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic and idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res*, 44(2-3), 191-195.
- Sturtz, F. G., Chazot, G., & Vandenberghe, A. J. (1992). Charcot-Marie-Tooth disease from first description to genetic localization of mutations. *J Hist Neurosci*, 1(1), 47-58.
- Takahashi, N., Chernavvsky, D. R., Gomez, R. A., Igarashi, P., Gitelman, H. J., & Smithies, O. (2000). Uncompensated polyuria in a mouse model of Bartter's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10), 5434-5439.
- Turecki, G., Grof, P., Grof, E., D'Souza, V., Lebuis, L., Marineau, C., et al. (2001). Mapping susceptibility genes for bipolar disorder: a pharmacogenetic approach based on excellent response to lithium. *Mol Psychiatry*, 6(5), 570-578.
- Umemoto, T., Inomoto, T., Ueda, K., Hamaguchi, M., & Kioka, N. (2009). v-Src-mediated transformation suppresses the expression of focal adhesion protein vinexin. *Cancer Lett*, 279(1), 22-29.
- Uyanik, G., Elcioglu, N., Penzien, J., Gross, C., Yilmaz, Y., Olmez, A., et al. (2006). Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology*, 66(7), 1044-1048.
- Vanasse, M., Masson, P., Geoffroy, G., Larbrisseau, A., & David, P. C. (1984). Intermittent treatment of febrile convulsions with nitrazepam. *Can J Neurol Sci*, 11(3), 377-379.
- Warner, L. E., Hilz, M. J., Appel, S. H., Killian, J. M., Kolodry, E. H., Karpati, G., et al. (1996). Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron*, 17(3), 451-460.
- Wenz, M., Hartmann, A. M., Friauf, E., & Nothwang, H. G. (2009). CIP1 is an activator of the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2. *Biochem Biophys Res Commun*, 381(3), 388-392.
- Woo, N. S., Lu, J., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D. B., et al. (2002). Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus*, 12(2), 258-268.
- Xiong, Z. Q., & Stringer, J. L. (2000). Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in the dentate gyrus. *J Neurophysiol*, 83(3),

1443-1451.

- Xu, J. C., Lytle, C., Zhu, T. T., Payne, J. A., Benz, E., Jr., & Forbush, B., 3rd. (1994). Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(6), 2201-2205.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., et al. (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*, *105*(5), 587-597.
- Zierler, S., Frei, E., Grissmer, S., & Kerschbaum, H. H. (2008). Chloride influx provokes lamellipodium formation in microglial cells. *Cell Physiol Biochem*, *21*(1-3), 55-62.

Annexes

