

Université de Montréal

**Fonction de la protéine Ceroid lipofuscinosis neuronal 5
(CLN5) dans le tri et le recyclage à l'endosome**

par
Félix Jules

Biochimie et Médecine Moléculaire
Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en Biochimie et Médecine Moléculaire

Avril, 2015

© Félix Jules, 2015

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Fonction de la protéine Ceroid lipofuscinosis neuronal 5 (CLN5) dans le tri et le recyclage à
l'endosome

Présentée par :

Félix Jules

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luis A. Rokeach, président-rapporteur

Dr Puttaswamy Manjunath, directeur de recherche

Dr Stéphane Lefrançois, co-directeur de recherche

Dr Elliot Drobetsky, membre du jury

Dr John Presley, examinateur externe

Dr Przemyslaw (Mike) Sapieha, représentant du doyen

Résumé

Le tri et le transport efficace des hydrolases acides vers le lysosome jouent un rôle critique pour la fonction des cellules. Plus de 50 maladies humaines sont dues à des mutations des enzymes lysosomales, des protéines régulant des processus-clés du transport vers le lysosome ou des enzymes effectuant des modifications posttraductionnelles importantes pour la fonction du lysosome. L'objectif de cette thèse est d'identifier des protéines et des mécanismes permettant à la cellule de réguler le transport des enzymes vers le lysosome. Nous avons formulé l'hypothèse que des protéines mutées dans des maladies lysosomales et dont les fonctions étaient inconnues pouvaient jouer un rôle dans le transport vers le lysosome. Les céréoïdes-lipofuscinoses neuronales forment une famille de maladies lysosomales rares mais sont aussi les maladies neurodégénératives infantiles les plus fréquentes. Plusieurs gènes impliqués dans les NCL encodent des protéines aux fonctions inconnues. Les travaux présentés dans cette thèse ont identifié la protéine « ceroid lipofuscinosis neuronal-5 » (CLN5) qui est localisée à l'endosome et au lysosome comme élément nécessaire au recrutement et à l'activation de rab7. Rab7 est une protéine Rab-clé qui contrôle le trafic à l'endosome tardif. Cette petite GTPase est impliquée dans le recrutement de retromer, un complexe protéique qui régule le trafic de l'endosome vers l'appareil de Golgi des récepteurs de tri lysosomal comme sortilin et le récepteur du mannose-6-phosphate. Dans les cellules où CLN5 est déplété, les récepteurs de tri lysosomal sont moins recyclés plus rapidement dégradés. En utilisant des expériences de photomarquage nous avons aussi pu démontrer que Rab7 est moins activées en l'absence de CLN5.

Pour exécuter leur fonction les protéines rabs doivent être recrutée à la membrane et activées par l'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP. Le recrutement des Rabs à la membrane nécessite une modification posttraductionnelle lipidique pour être facilités. En utilisant un modèle de levures nous avons démontré que l'homologue de Rab7, Ypt7 est palmitoylée. Nous avons aussi démontré que la palmitoyltransférase Swif1 est nécessaire au recrutement de Ypt7 à la membrane. Nous avons aussi remarqué que les sous-unités de retromer chez la levure sont moins recrutées lorsque les palmitoyltransférases sont déplétées. Dans les cellules de mammifères nous avons démontré que Rab7 est également palmitoylé et que cette palmitoylation est possiblement effectuée par les palmitoyltransférases DHHC1 et DHHC8. La palmitoylation de Rab7 a lieu sur les cystéines en C-terminal qui sont nécessaires au recrutement membranaire et qui auparavant étaient uniquement décrites comme prénylées. En utilisant la méthode de « click chemistry » nous avons découvert que lorsque la prénylation de Rab7 est bloquée le niveau de palmitoylation augmente.

Pour caractériser l'interaction entre CLN5 et Rab7 nous avons performé des expériences afin d'établir définitivement la topologie de cette protéine. Nous avons ainsi démontré que CLN5 est une protéine hautement glycosylée qui est initialement traduite en protéine transmembranaire et subséquentment clivée par un membre de la famille des peptidase de peptide signal (SPP). Cette protéine soluble peut alors possiblement interagir avec CLN3 qui est aussi palmitoylée pour recruter et activer Rab7.

Nos études suggèrent pour la première fois que CLN5 pourrait être un recruteur et un activateur de Rab7 qui agirait avec la protéine CLN3 pour séquestrer Rab7 avec les autres récepteurs palmitoylés et permettre leur recyclage vers l'appareil de Golgi.

Mots-clés : Céroïde-lipofuscinose neuronale, CLN3, CLN5, Rab7, Ypt7, lipidation, prénylation, palmitoylation, DHH1, DHH8, rétromer, sortilin, MPR, CI-MPR, récepteurs de tri lysosomal, endosomes, lysosomes

Abstract

The proper sorting and trafficking of acid hydrolases plays a critical role in the normal function of cells. Over 50 known human diseases are caused by mutations of lysosomal enzymes, of proteins that regulate key processes of transport to the lysosome or of enzymes that perform posttranslational modifications which are important for the function of the lysosome. The main objective of this thesis is to identify proteins and mechanisms that allow the cell to regulate the transport of enzymes toward the lysosome. We formulated the hypothesis that proteins mutated in lysosomal diseases and that have no known functions could play a role in transport toward the lysosome. Neuronal ceroid-lipofuscinoses form a family of lysosomal storage disorders that are very rare but are also the most frequent infantile neurodegenerative diseases. The work presented in this thesis identified ceroid-lipofuscinosis neuronal-5 (CLN5), which is located at the late-endosomal/lysosomal compartment as a necessary element for the recruitment and activation of Rab7. Rab7 is an important GTPase that controls traffic from the late-endosome to the trans-Golgi network. Rab7 has been implicated in the recruitment of the retromer complex, which regulates retrograde transport of the lysosomal sorting receptor such as sortilin and the mannose-6-phosphate receptor. In the cells where CLN5 is depleted, the lysosomal sorting receptors are less recycled and degraded more rapidly. Using photolabelling assays we were also able to show that Rab7 is less activated in the absence of CLN5.

To perform their function, Rab proteins have to be recruited to membranes and activated by the exchange of a GDP nucleotide for GTP. The recruitment of Rabs to membranes necessitates a lipidic posttranslational modification to raise the affinity. Using yeast as a model we demonstrated that the Rab7 homolog, Ypt7 is palmitoylated. We have also showed that the yeast palmitoyltransferase Swi1 is required for Ypt7 membrane recruitment. We have also observed that retromer subunits in yeast are less recruited when palmitoyltransferases are depleted. In mammals we have shown that Rab7 is also palmitoylated and that this palmitoylation may be done by palmitoyltransferases DHHC1 and DHHC8. The palmitoylation of Rab7 occurs on the C-terminal cysteines that are required for membrane recruitment and were previously only shown to be prenylated. By using Click chemistry we have discovered that when Rab7 prenylation is blocked the level of palmitoylation is augmented.

To characterize the interaction of Rab7 and CLN5 we performed experiments to definitively establish the topology of this latter protein. Our results show that CLN5 is a heavily glycosylated protein that is initially translated as a type II transmembrane protein and subsequently cleaved by a member of the signal-peptide peptidase (SPP) family. This protein can then possibly interact with another member of the CLN family, CLN3 that is predicted to be palmitoylated to recruit and activate Rab7.

Our studies establish for the first time that CLN5 is required for the recruitment and activation of Rab7 and may cooperate with the possibly palmitoylated protein CLN3 to

sequester Rab7 in specific membrane domains with sorting receptors to allow their recycling toward the trans-Golgi network.

Keywords : Neuronal-ceroid lipofuscinosis, NCL, CLN3, CLN5, Rab7, Ypt7, lipidation, prenylation, palmitoylation, DHHC1, DHHC8, retromer, sortilin, MPR, CI-MPR, lysosomal sorting receptors, lysosomal storage disorders, endosomes, lysosomes

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations et symboles.....	xiv
Remerciements.....	xviii
Contributions aux articles.....	xix
Chapitre 1.....	1
1. Introduction.....	2
1.1 Le lysosome.....	2
1.1.1 Historique.....	2
1.1.2 Structure et fonction.....	3
1.2 Synthèse des enzymes lysosomales.....	6
1.2.1 Synthèse et glycosylation dans le réticulum endoplasmique.....	6
1.2.2 Signalisation par le mannose-6-phosphate.....	9
1.3 Les récepteurs de tri au lysosome.....	10
1.3.1 Les récepteurs de mannose-6-phosphate.....	10
1.3.2 Sortilin et les récepteurs alternatifs de tri vers le lysosome.....	13
1.4 Le transport vers l'endosome.....	16
1.4.1 Les motifs de tri.....	16
1.4.2 La formation de vésicules.....	17
1.5 Le recyclage des récepteurs de tri au lysosome.....	19
1.5.1 Le complexe retromer.....	19
1.6 Les GTPases « ras-like in rat brain ».....	21
1.6.1 Historique.....	21

1.6.2 Mécanisme	21
1.6.3 Rab7	23
1.7 Les types de lipidations.....	25
1.7.1 La prénylation	27
1.7.2 La palmitoylation.....	28
1.8 Les maladies lysosomales.....	32
1.8.1 Les maladies liées aux enzymes	32
1.8.2 Maladies causées par un défaut de modifications post-traductionnelles	33
1.8.3 Maladies causées par un défaut de transport des enzymes	34
1.8.4 Maladies causées par un défaut d'une protéine membranaire non-enzymatique	34
1.8.5 Maladies causées par un défaut d'une protéine non-enzymatique soluble	35
1.9 Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales.....	37
1.9.1 Les NCL adultes	39
1.9.2 Les NCL juvéniles	39
1.9.3 Les NCL infantiles et infantiles tardives	40
1.10 Traitements des maladies lysosomales	42
1.10.1 La greffe de moelle osseuse.....	42
1.10.2 La thérapie enzymatique de substitution.....	43
1.10.3 Limites et autres traitements	44
1.11 Objectifs de la thèse	45
Chapitre 2.....	47
2. Article 1	48
2.1 Abstract.....	49
2.2 Introduction.....	50
2.3 Materials and methods	53
2.4 Results.....	59
2.5 Discussion	68
2.6 Acknowledgements.....	71
2.7 References.....	72
2.8 Figures.....	77

Chapitre 3.....	96
3. Article 2	97
3.1 Abstract.....	99
3.2 Introduction.....	100
3.3 Materials and methods	102
3.4 Results.....	107
3.5 Discussion	115
3.6 Acknowledgements.....	118
3.7 Author contributions	118
3.8 References.....	119
3.9 Figures.....	125
Chapitre 4.....	136
4. Discussion.....	137
4.1 Implication de CLN5 dans le recyclage des récepteurs de tri vers l'endosome	139
4.2 Rôle de CLN5 sur l'activation de Rab7	140
4.3 La topologie de CLN5	143
4.4 CLN5 est clivé par SPPL3	144
4.5 Les interactions de CLN5	146
4.6 Le rôle de la palmitoylation	147
4.7 Rab7 est palmitoylée chez les mammifères	150
Conclusion	153
Références (Introduction et discussion).....	i
Annexes.....	i
Annexe 1 : Article.....	ii
A1.1 Abstract	iii
A1.2 Introduction.....	iv
A1.3 Materials and methods	vi
A1.4 Results and discussion	viii
A1.5 Acknowledgements.....	xvi

A1.6 References.....	xvii
A1.7 Figures.....	xxi
Annexe 2 : Résultats non-publiés	xxvii

Liste des tableaux

Tableau I. Les maladies lysosomales.....	36
Tableau II. Les NCL.....	38

Liste des figures

Figure 1.1 Fonctions et formation des lysosomes.....	5
Figure 1.2 La translocation et la glycosylation au réticulum endoplasmique.....	8
Figure 1.3 Les récepteurs de mannose-6-phosphate.....	12
Figure 1.4 Transport par les récepteurs de mannose-6-phosphate.....	15
Figure 1.5 La formation de vésicules.....	18
Figure 1.6 Le complexe retromer.....	20
Figure 1.7 Le cycle d'activation des Rabs.....	22
Figure 1.8 Protéines effectrices de rab7.....	25
Figure 1.9 Les types de lipidations.....	26
Figure 1.10 La famille DHHC.....	31
Figure 2.1 CLN5 interacts with the lysosomal sorting receptors.	78
Figure 2.2 CLN5 is required for the localization of CI-MPR and sortilin.	80
Figure 2.3 CI-MPR and sortilin are degraded in CLN5-depleted cells.	82
Figure 2.4 Recruitment of the Vps26 subunit of retromer to endosomes requires CLN5.	84
Figure 2.5 CLN5 is required to recruit retromer to endosomal membranes.....	85
Figure 2.6 The cytosolic distribution and membrane distribution of Vps26 and Vps35 are altered in CLN5-depleted cells.....	88
Figure 2.7 Transient expression of wild-type HA-CLN5 rescues the recruitment of Vps26 in CLN5-depleted cells.....	89
Figure 2.8 CLN5 is required for the localization of Rab7.....	92
Figure 2.9 CLN5 is required for the activation of Rab7.	93
Figure 2.10 Model showing the role of CLN5 in sorting from the endosomes.....	95
Figure 3.1 HA tagged CLN5 is cleaved and glycosylated.....	126
Figure 3.2 CLN5 is a type II transmembrane protein cleaved to a soluble protein.	127
Figure 3.3 CLN5 is cleaved after residue 92.....	130
Figure 3.4 (Z-LL) ₂ -Ketone prevents the cleavage of proCLN5 to mCLN5.....	131
Figure 3.5 SPPL3 cleaves proCLN5 to mCLN5.....	133

Figure 3.6 The N-terminal tail of CLN5 is not required for its localization.	134
Figure A1.1 Non-palmitoylated sortilin is ubiquitinated at lysine 818.	xxi
Figure A1.2 Depletion of TSG101 prevents the degradation of sortilin.	xxii
Figure A1.3 Overexpression of Nedd4 results in increased degradation of sortilin.	xxiii
Figure A1.4 The ubiquitin ligase activity of Nedd4 is required to degrade sortilin.	xxv
Figure A2.1 Ypt7p est palmitoylé.	xxix
Figure A2.2 La palmitoylation chez la levure.	xxx
Figure A2.3 Rab7 est palmitoylé.	xxxii
Figure A2.4 Rab7 interagit avec DHHC1 et DHHC8.	xxxiii
Figure A2.5 La délétion des DHHC diminue la palmitoylation de Rab7.	xxxiv

Liste des abréviations et symboles

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
Akr 1 : Ankyrin repeat-containing protein 1
Amp : Ampicilin
ANCL : Adult neuronal ceroid-lipofuscinosis
AP : Adaptor protein
Arf : Adénosine diphosphate ribosylation factor
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BAR : Bin/Amphiphysin/Rvs
Ccz1 : Calcium caffeine zinc sensitivity 1
CD-MPR : Récepteur de mannose-6-phosphate cation-dépendant
CI-MPR : Récepteur de mannose-6-phosphate cation-indépendant
Cl⁻ : Chlorure
CLC : Canaux transporteurs de chlorure
CLN : Céroïde-lipofuscinose neuronale
COP : Coat protein
CPY : Carboxypeptidase Y
CSC : Complexe cargo-sélectif
DHHC : Aspartate-histidine-histidine-cystéine
EDEM : ER degradation-enhancing α -mannosidase-like
Erf : Effect on Ras
ERMan I : Mannosidase du réticulum endoplasmique I
ERT : Enzyme replacement therapy
FGE : Formylglycine generating enzyme
FYCO1 : FYVE and coiled-coil domain containing protein 1
GAP : GTPase activating protein

GDF : GDI dissociation factor
GDI : guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP : Guanosine diphosphate
GEF : Guanine nucleotide exchange factor
GGA : Golgi-associated γ -ear containing arf-binding protein
GlsI : Glucosidase I
GlsII : Glucosidase II
GlcNac-1 phosphotransférase : UDP-N-acetylglucosamine : lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase
GST : glutathion S-transférase
GTP : Guanosine triphosphate
GTPase : Guanine nucleotide binding protein
HA : Human influenza hemagglutinin
Hhat : Hedgehog acetyltransferase
HOPS : Homotypic fusion and vacuole protein sorting
IGF II : Insulin-like growth factor II
INCL : Infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JNCL : Juvenile neuronal ceroid-lipofuscinosis
kDa : kiloDalton
LB : Lysogeny broth
LAMP : Lysosome-associated membrane protein
LIMP-2 : Lysosomal integral membrane protein 2
LINCL : Late-infantile neuronal lipofuscinosis
LRP : Low density lipoprotein receptor-related protein
M6P : Mannose-6-phosphate
Mon1 : Monensin sensitivity 1
MPR : Récepteurs de mannose-6-phosphate
MSD : Multiple sulfatase deficiency
NCL : Neuronal-ceroid lipofuscinosis
NPC : Syndrome de Niemann-Pick de type C

ORP1L : Oxysterol-binding protein–related protein 1L
OST : Oligosaccharyltransferase
PPT1 : Palmitoyl-protein thioestérase 1
PtdIns(3)P, PI-3-P : Phosphatidylinositol 3-phosphate
PI4P : Phosphatidylinositol 4-phosphate
Rab : Ras-like in rat brain
Ras : Rat sarcoma
REP : Rab escort protein
RER : Réticulum endoplasmique rugueux
RFP : Red fluorescent protein
RGGT : Rab géranyl géranyl transférase
RILP : Rab7-interacting lysosomal protein
Shh : Sonic Hedgehog
siRNA : Silencing ribonucleic acid
Snx : Sorting nexin
SPP : Signal-peptide peptidase
SPPL : Signal-peptide peptidase-like
SRP : Particule de reconnaissance du peptide-signal
Swf1 : Spore wall formation protein 1
TBC1D15 : Tre-2-Budding Uninhibited By Benzimidazole-Cell Division Cycle 16 Domain, Domain Family Member 15
TLC : TRAM1–Lag1p–CLN8 (Translocation associated membrane protein 1-Longevity assurance gene 1 protein-Ceroid-lipofuscinosis neuronal 8)
TPP1 : Tripeptidyl-peptidase
UCE : Uncovering enzyme
 μM : micromolaire
vLINCL_{Fin} : Finnish-variant late-infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis
VPS : Vacuolar protein sorting
Ypt : Yeast protein transport
(Z-LL)₂-ketone : 1, 3-di-(N-carboxybenzoyl-L-leucyl-L-leucyl) amino acetone

*À mes parents dont le soutien et les sacrifices m'auront permis d'être le premier d'une longue
lignée de docteurs Jules.*

Remerciements

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien constant de plusieurs personnes tout au long de mes études. Je tiens à remercier mes directeurs de recherche, premièrement le docteur Stéphane Lefrançois qui m'a offert l'opportunité de faire des recherches dans son laboratoire. Ces années compteront toujours comme les meilleures années de ma vie et ma gratitude pour cette formation inestimable sera éternelle. Merci aussi au docteur Puttaswamy Manjunath qui même si je ne faisais pas mes recherches dans son laboratoire m'a toujours considéré comme un de ces étudiants et m'a donné des conseils et m'a permis de profiter de sa grande expérience.

Ensuite, merci à mes parents, André-Frigo Jules et Primose Jolice qui ont toujours cru en mes possibilités et ce sont assurés que je ne manque de rien tout comme leur sept autres enfants. Le travail aura été énorme et je suis fier de leur montrer le résultat de tant d'années d'efforts.

Merci aussi au reste de ma famille et à mes amis, particulièrement Rémy Vanherweghem qui m'a apporté une aide indispensable durant les dernières années de mon doctorat. Merci à mes collègues, surtout à Karine Dumaresq-Doiron qui m'a aidé dans toutes mes expériences toutes ces années. Je tiens aussi à remercier le docteur Santiago Costantino et les membres de son équipe pour leurs nombreux conseils. Finalement merci aux membres de mon comité de thèse, le docteur Luc DesGroseillers et le docteur Elliot Drobetsky qui ont suivi ma progression et fourni des conseils indispensables pour mon cheminement.

Contributions aux articles

Article 1 – Publié dans Mol Cell Biol.

Mamo A*, Jules F*, Dumaresq-Doiron K, Costantino S, Lefrancois S.

*co-premiers auteurs

The role of ceroid lipofuscinosis neuronal protein 5 (CLN5) in endosomal sorting

Ma contribution concerne la conceptualisation et l'exécution des expériences ainsi que l'analyse des résultats. J'ai aussi participé à la rédaction du manuscrit ainsi qu'effectué toutes les corrections demandées par les réviseurs.

Article 2- Soumis pour publication dans J Biol Chem.

Jules F, Sauvageau E, Dumaresq-Doiron K, Mazzaferri J, Costantino S, Lefrancois S.

*co-premiers auteurs

Ceroid-lipofuscinosis neuronal 5 (CLN5) is cleaved by members of the SPP family to produce a mature soluble protein

Ma contribution concerne la conceptualisation et l'exécution des expériences ainsi que l'analyse des résultats. J'ai préparé la majorité des figures et contribué à la rédaction du manuscrit.

Annexe 1- Publié dans Biochem Biophys Res Commun.

Dumaresq-Doiron K, Jules F, Lefrancois S.

Sortilin turnover is mediated by ubiquitination.

Ma contribution concerne la conceptualisation des expériences, l'analyse des résultats et la rédaction du manuscrit.

Chapitre 1

1. Introduction

1.1 Le lysosome

1.1.1 Historique

Le lysosome est un compartiment intracellulaire délimité par une membrane lipidique dont la fonction principale est la dégradation de matériaux biologiques de toutes sortes (protéines, acides nucléiques, carbohydrates, etc.). Cet organite fût découvert par Christian de Duve en 1949 alors que lui et son équipe voulait étudier la glucose-6-phosphatase par fractionnement cellulaire [1]. Leurs expériences comparaient l'activité de la glucose-6-phosphatase à celle de l'acide phosphatase hépatique non spécifique et ils remarquèrent que l'activité de cette enzyme n'était qu'une fraction de ce qu'ils s'attendaient à mesurer [2]. Par contre, la détection beaucoup plus élevée de l'acide phosphatase dans des échantillons ayant passés quelques jours au réfrigérateur les amena à formuler l'hypothèse que cette enzyme était enfermée dans un compartiment puis relâchée lorsque la membrane de ce compartiment était rompue. Le développement alors récent des techniques de fractionnement à permis cette découverte parce qu'elles étaient moins mécaniquement draconiennes que les techniques précédentes. Ils qualifièrent cette propriété de l'enzyme d'être retenue et progressivement relâchée de « latence ». Au fil des années l'équipe du Dr de Duve observât d'autres enzymes qui possédaient aussi cette propriété de latence et en 1955 après la découverte de 5 de ces

enzymes qui avaient pour la plupart des propriétés digestives ils nommèrent les compartiments les contenant des « lysosomes » [3-5].

1.1.2 Structure et fonction

Les lysosomes sont des organelles principalement sphériques ayant des diamètres de 0,1 à 1,2 μM [6]. Le matériel dégradé dans les lysosomes provient de plusieurs sources. Il peut s'agir de contenu extracellulaire comme des bactéries ou des nutriments absorbés par la cellule par endocytose [7, 8] ou par phagocytose [9, 10]. Le contenu à dégrader peut aussi être des composantes que la cellule veut déconstruire pour réutiliser le matériel primaire obtenu par autophagie [11] (Figure 1.1).

La fonction de dégradation du lysosome est accomplie par l'action de plus de 50 enzymes de plusieurs types incluant des phosphatases, des lipases, des nucléases, des glycosidases et d'autres [12-14].

Les hydrolases lysosomales fonctionnent à un pH acide ≤ 5 [15]. Le pH interne du lysosome est donc maintenu à un niveau plus acide que celui du reste de la cellule par des protéines transmembranaires. Le mécanisme d'acidification du lysosome est effectué par une « V-type » ATPase qui utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP pour transporter des protons à l'encontre du gradient membranaire [16]. Pour fonctionner le

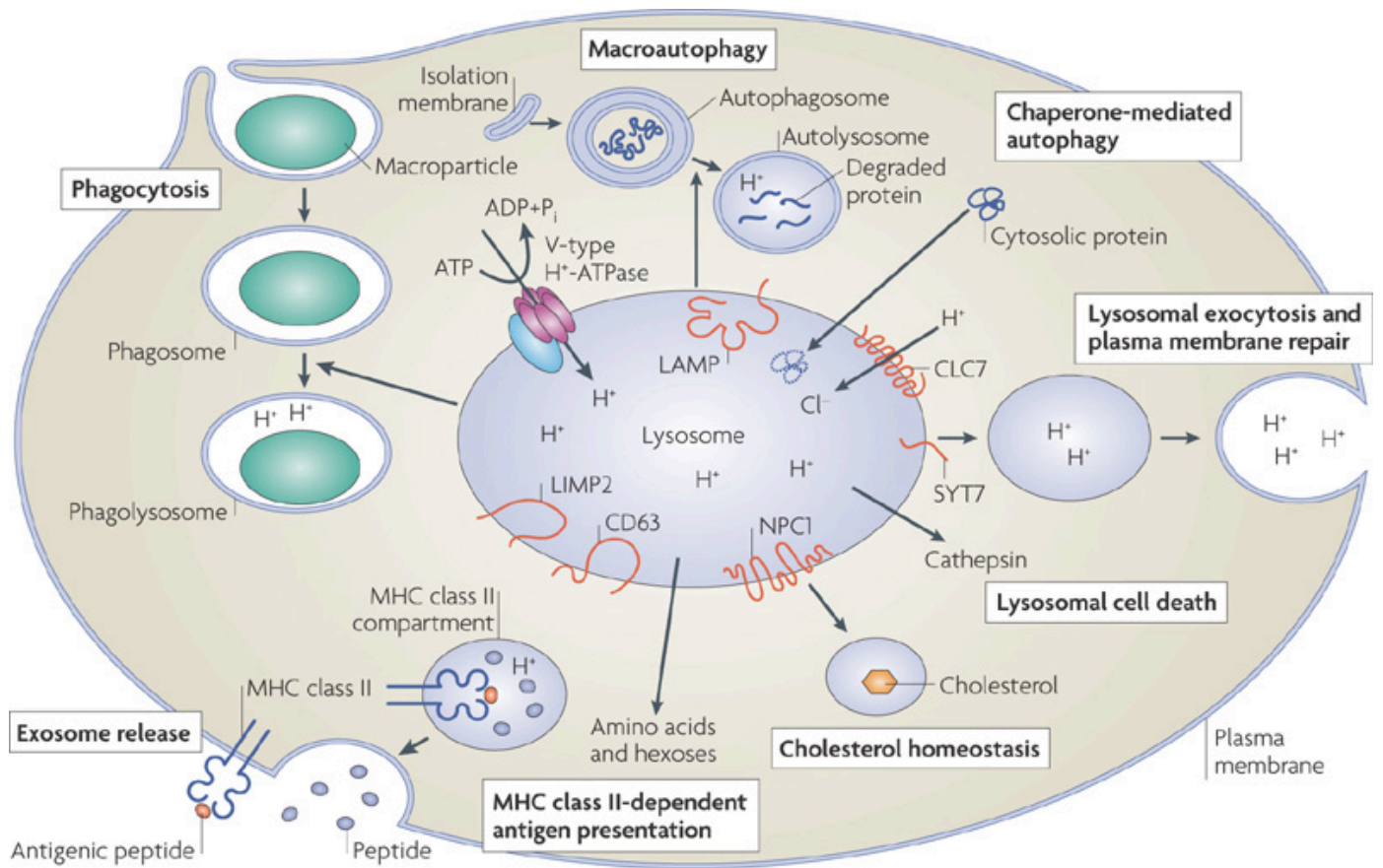
mécanisme d'acidification par pompage de protons doit être contrebalancé par le transport passif d'anions ou de cations de la lumière du lysosome vers le cytoplasme [17]. Le transport d'ions Cl^- est principalement effectué par un contre-transporteur Cl^-/H^+ , CLC-7, qui effectue l'échange de deux ions chlorure pour un proton afin de contribuer à l'acidification [18, 19]. Le lysosome n'est pas le seul organelle qui utilise ce système pour maintenir son pH interne et les mécanismes exacts que la cellule utilise pour maintenir le pH spécifique retrouvé dans chaque compartiment demeure encore mal compris [20].

Les lysosomes sont présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Certains types de cellules ont toutefois acquis des compartiments semblables aux lysosomes qui possèdent les mêmes caractéristiques en plus de certaines enzymes leur permettant d'accomplir leurs fonctions spécifiques [21, 22]. Les mélanosomes par exemple qui sont présents dans les mélanocytes et les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine sont responsables de la fabrication de la mélanine qui colore les cheveux et la peau et permet de protéger les mammifères des rayons ultraviolets [23]. Les granules lytiques présents dans les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules tueuses naturelles contiennent des perforines et des granzymes que ces cellules du système immunitaire utilisent pour causer l'apoptose des cellules infectées par des virus [24].

Sa fonction de maintenance de l'homéostasie et son rôle de dégradation de matériaux acquis aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule rend le lysosome très important pour la survie non seulement de la cellule mais des organismes au complet. Son bon

fonctionnement doit donc être assuré par un transport efficace des enzymes et des protéines membranaires qui y résident. Les prochaines sections traiteront donc des mécanismes de formation et de transport de ces protéines.

Figure 1.1 Fonctions et formation des lysosomes



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

(Tiré de Saftig *et al.*, 2009, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.) [25]

1.2 Synthèse des enzymes lysosomales

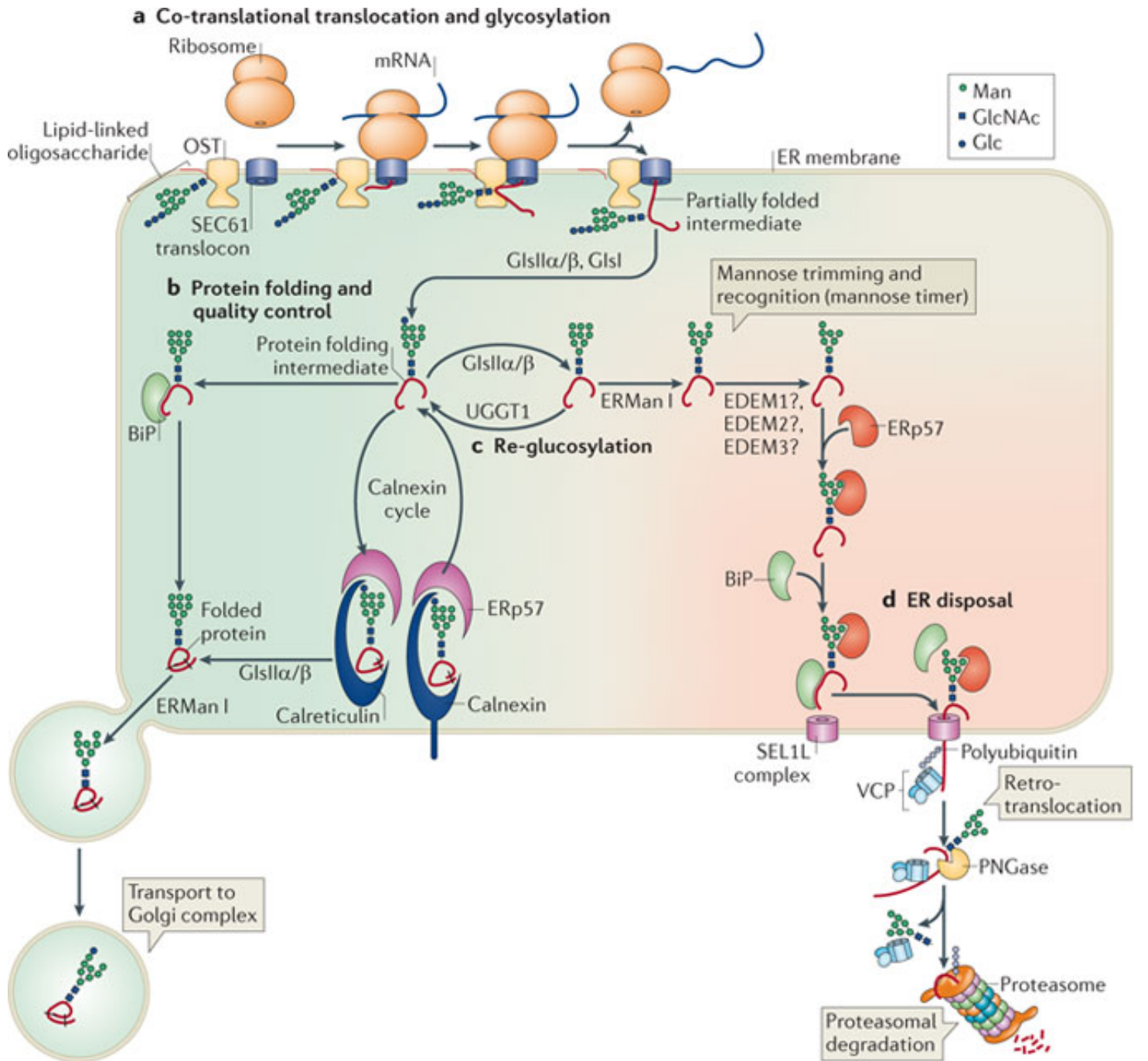
1.2.1 Synthèse et glycosylation dans le réticulum endoplasmique

Les hydrolases acides résidant dans le lysosome sont traduites avec les protéines devant être sécrétées et les protéines de la membrane plasmique par des polyribosomes à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER) [26]. La région N-terminale de ces protéines contient un peptide-signal hydrophobe de 20 à 25 acides aminés permettant leur translocation au début de la traduction de l'ARN messager afin qu'elles ne soient pas relâchées dans le cytosol [27]. Le peptide-signal est reconnu par la particule de reconnaissance du peptide-signal (SRP) qui transporte la protéine naissante au translocon [28-30]. Après la synthèse de la protéine le peptide-signal est clivé par une signal-peptidase ce qui cause la relâche de l'enzyme dans la lumière du RER (Figure 1.2, a) [31].

Pendant leur synthèse les enzymes lysosomales sont glycosylées par l'oligosaccharyltransférase (OST) qui ajoute sur certaines asparagines des molécules préformées d'oligosaccharides $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ à partir d'un intermédiaire lipidique [32-34] (Figure 1.2, a). La glucosidase I (GlsI) [35] enlève ensuite le résidu de glucose terminal et la glucosidase II (GlsII) [36] continue la maturation en retirant deux glucoses centraux [37, 38]. Les enzymes lysosomales comportant maintenant un monoglucose sont ensuite repliées par des chaperonnes telle la calnexine, la calréticuline et BiP qui assurent la qualité du repliement

[34, 39, 40] (Figure 1.2, b). Après le repliement correct de l'enzyme, le clivage du dernier résidu de glucose permet la relâche par les chaperonnes. Les glycoprotéines interagissent ensuite avec la mannosidase I (ERMan I) du réticulum endoplasmique pour produire des intermédiaires octamannosyl qui sont transportés dans l'appareil de Golgi par des vésicules enrobées par COPII [41, 42] (Figure 1.2, b). Les glycoprotéines mal repliées sont reconnues par UGGT1 et reglucosylées afin de réintégrer le cycle des chaperonnes (Figure 1.2, c). Seules les enzymes ayant été correctement repliées quittent le RER vers le Golgi. Les autres sont dégradées dans le protéasome après le retrait de leurs résidus de mannose par ERMan I et d'autres mannosidases suivi de l'intervention des membres de la famille EDEM [34, 43] (Figure 1.2, d).

Figure 1.2 La translocation et la glycosylation au réticulum endoplasmique



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

(Tiré de Moremen et al., 2012, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.) [34]

1.2.2 Signalisation par le mannose-6-phosphate

La modification la plus importante des enzymes lysosomales est la phosphorylation de résidus de mannose pour former des molécules de mannose-6-phosphate (M6P). Cette modification permet de distinguer les glycoprotéines devant se rendre au lysosome des autres protéines glycosylées. Deux enzymes effectuent l'addition du M6P sur les enzymes lysosomales, UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc): lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase ou (GlcNAc-1 phosphotransférase) [44] et N-acetylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acetylglucosaminidase ou « uncovering enzyme » (UCE) (Figure 1.4) [45]. La GlcNAc-1 phosphotransférase agit dans un compartiment pré-golgien pour former un intermédiaire phosphodiester [46]. Certaines des enzymes peuvent être phosphorylées une seconde fois dans l'appareil de Golgi qui contient alors une population d'enzymes mono- ou di- phosphorylées [47, 48]. L'enzyme UCE peut ensuite retirer un N-acetylglucosamine afin d'exposer le résidu phosphate [49]. Les enzymes marquées par le M6P peuvent finalement être reconnues par des récepteurs de tri lysosomal (Figure 1.4).

1.3 Les récepteurs de tri au lysosome

1.3.1 Les récepteurs de mannose-6-phosphate

Lorsque les enzymes lysosomales sont marquées par le mannose-6-phosphate elles sont reconnues par différents récepteurs dans l'appareil de Golgi. Ces récepteurs de mannose-6-phosphate (MPR) forment la famille des « P-type lectins » [50] dont il existe 2 membres, le récepteur de mannose-6-phosphate cation-dépendant (CD-MPR) et le récepteur de mannose-6-phosphate cation-indépendant (CI-MPR) (Figure 1.3) [51].

CI-MPR est une protéine transmembranaire de type I de 274 kDa [52]. Sa large région extracytoplasmique possède un domaine de 15 motifs répétés ayant jusqu'à 38 % de similarité entre elles et avec CD-MPR [53]. La région extracytoplasmique de CI-MPR possède aussi deux sites de reconnaissance du M6P [54] en plus d'un site qui reconnaît la « insulin-like growth factor II » (IGF II) (Figure 1.3) [55]. Ces sites lui donnent la double fonction de transport des enzymes vers le lysosome et un rôle dans le développement embryonnaire [55-57]. CI-MPR est aussi impliqué dans la fonction immunitaire en étant responsable de l'endocytose des granzymes A et B [58, 59].

CD-MPR est une protéine transmembranaire de type I également mais de beaucoup plus petite taille soit 31 kDa (Figure 1.3) [60]. La partie extracytoplasmique de ce récepteur ne

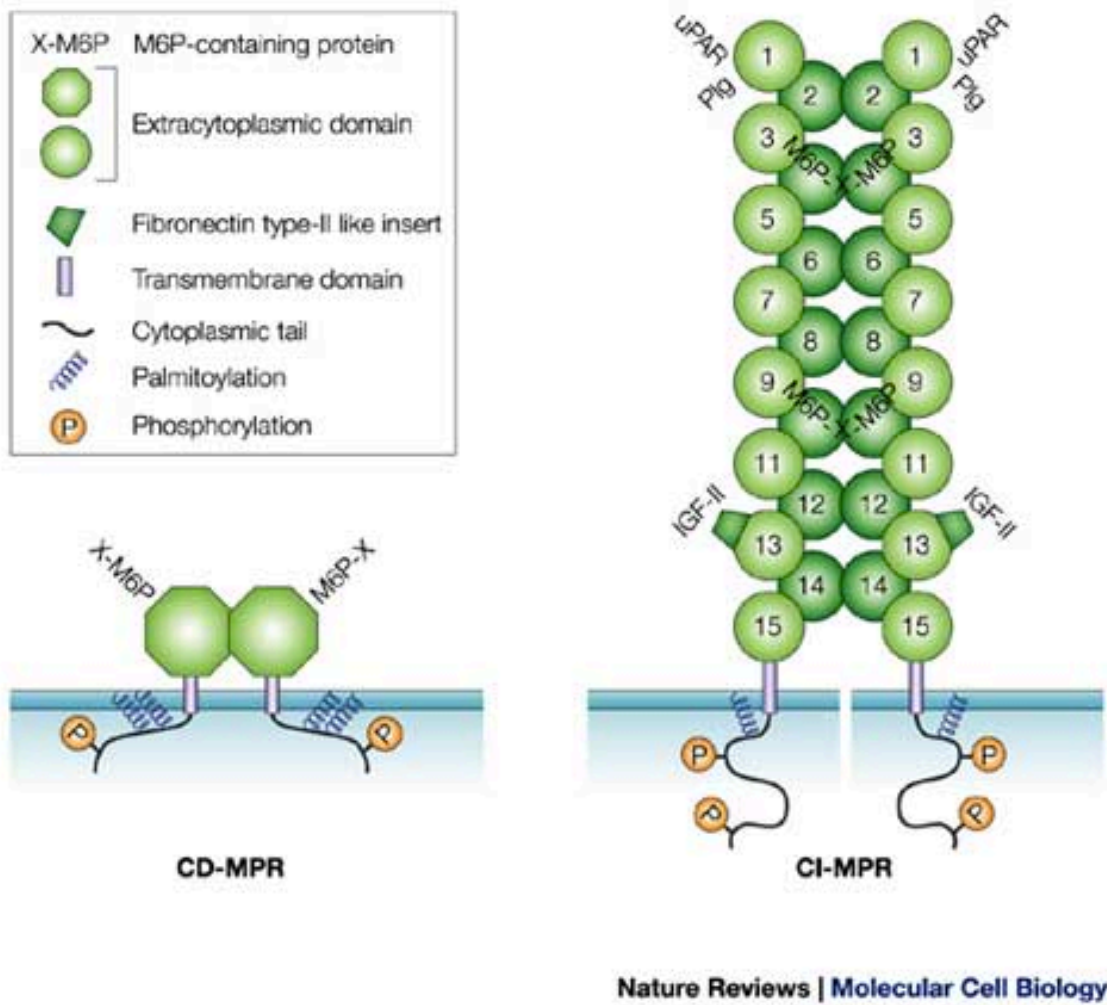
possède quant à elle qu'un seul site pouvant lier le M6P et aucun site de reconnaissance d'autres signaux à l'inverse de CI-MPR.

Le CD-MPR a été observé sous forme dimérique et tétramérique quoique la forme dimérique est la forme la plus observée [61, 62]. CI-MPR à l'opposé est principalement retrouvé sous forme de monomère [63] mais des études *in vitro* ont démontré que ce récepteur peut aussi former des dimères en présence de certains ligands [64]. La région extracytoplasmique des MPRs qui permet aussi la reconnaissance des signaux de M6P est suffisante pour permettre leur oligomérisation. Cette observation a mené à l'hypothèse que la formation de dimères permet aux récepteurs d'être plus spécifiques pour leurs différents ligands [64-66].

Malgré la similitude de leurs sites extracytoplasmique permettant de lier le M6P, les deux MPRs ne sont pas toujours interchangeables. Cette différence s'explique en partie par l'observation que le domaine le plus près de l'extrémité C-terminale de CI-MPR lie le M6P à un pH optimal entre 6,4 et 6,5 [67] semblable au pH optimal de liaison de CD-MPR qui est entre 6,0 et 6,5 [68, 69]. Le deuxième site de reconnaissance de CI-MPR par contre lie le M6P à un pH optimal entre 6,9 et 7,0 [50, 67]. Cette différence permet aussi au CI-MPR de fonctionner à la membrane plasmique même si le pH du milieu extracellulaire est plus alcalin [70]. Le nombre de résidus M6P et leur localisation sur les enzymes lysosomales expliquent aussi la différence de spécificité entre les deux MPR [71]. Des expériences de délétion de chaque MPR ont permises de séparer les enzymes qu'ils transportent en trois sous-groupes. Le

groupe I contient les enzymes qui sont secrétées en l'absence de CD-MPR ce qui veut dire qu'elles sont incapables d'interagir convenablement avec CI-MPR. Le groupe II à l'inverse est formé d'enzymes secrétées en l'absence de CI-MPR et finalement les enzymes du groupe III ne sont secrétées qu'en l'absence des deux récepteurs [72-74].

Figure 1.3 Les récepteurs de mannose-6-phosphate



(Tiré de Gosh *et al.*, 2003, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.) [75]

1.3.2 Sortilin et les récepteurs alternatifs de tri vers le lysosome

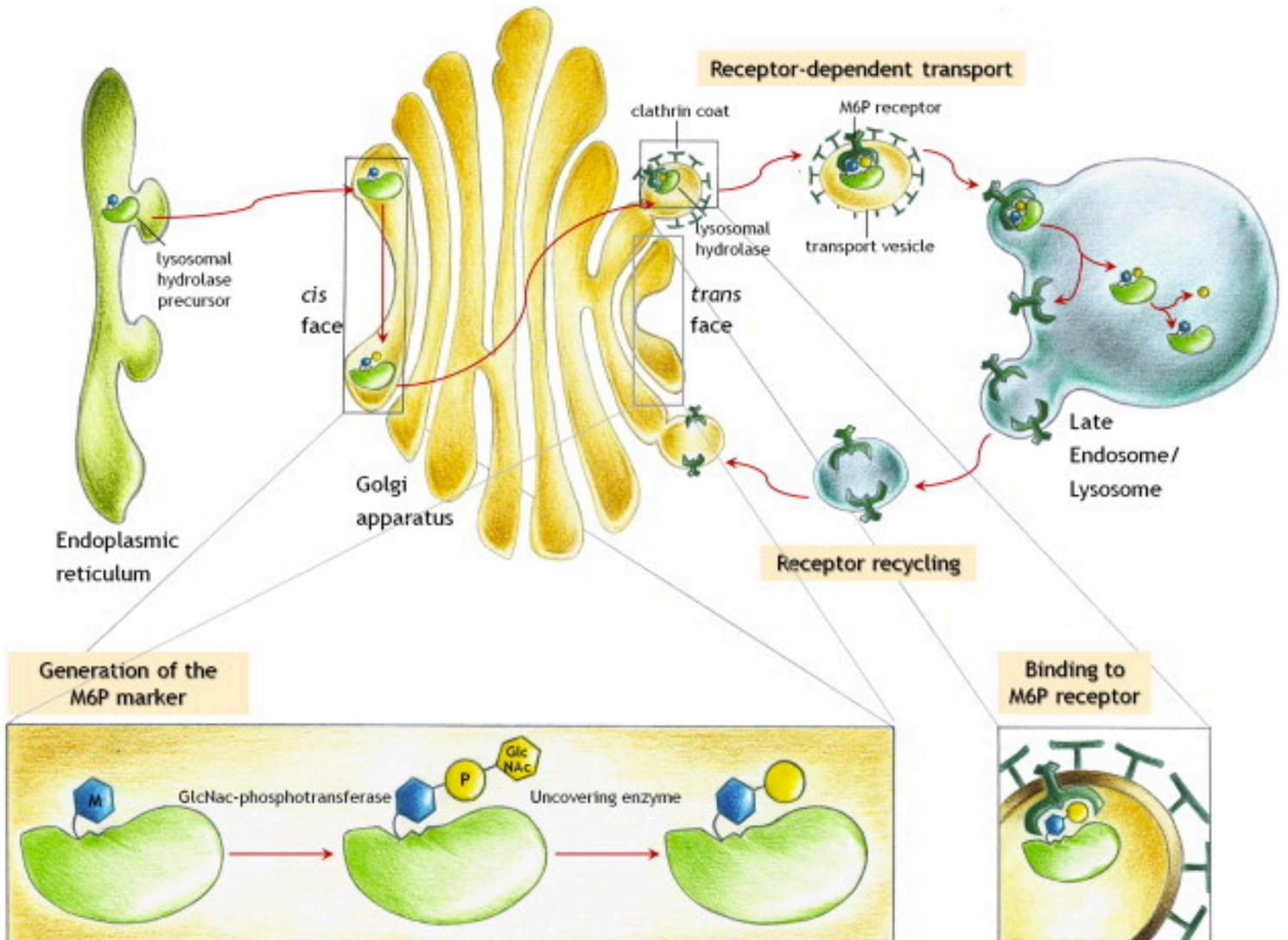
L'étude des MPR par délétion dans des modèles murins a démontré que le transport de certaines enzymes lysosomales dans différents types de cellules peut être indépendant du mannose-6-phosphate [76]. Un des récepteurs alternatifs pouvant être utilisé pour le transport de certaines enzymes au lysosome est sortilin. Cette protéine de 95 kDa a été identifiée lors d'un criblage visant à identifier des récepteurs agissant lors de l'endocytose [77]. C'est à cause de sa similitude avec le récepteur Vps10p qui sert au tri des enzymes dédiées à la vacuole chez la levure que son rôle dans le tri vers le lysosome chez les mammifères a été hypothétisé [78]. Depuis son identification comme récepteur de tri vers le lysosome plusieurs enzymes ont été identifiées comme ligand de sortilin. Entre autres on retrouve la protéine activatrice de GM2-ganglioside, les pro-saposins [79] et les sphingomyélinases acides [80]. Sortilin est grandement étudié pour son rôle au niveau des neurones puisque ce récepteur est impliqué dans le transport de la neurotensine ainsi que dans le trafic de plusieurs protéines dans les axones [81-84]. De plus, les souris knock-out du gène de sortilin montrent une accumulation d'apolipoprotéine E et d'amyloïde β ce qui implique un lien entre ce récepteur et la maladie d'Alzheimer [85].

Jusqu'à présent certains autres récepteurs ont été identifiés permettant aussi le transport d'enzymes vers le lysosome. Par exemple la « low density lipoprotein receptor related protein » (LRP) est responsable de l'internalisation des prosaposines [86]. La « lysosomal

integral membrane protein » de type 2 (LIMP-2) est quant à elle capable de transporter la β -glucocerebrosidase vers le lysosome [87].

Certaines enzymes semblent par ailleurs utiliser des co-récepteurs pour se rendre au lysosome. Un co-récepteur récemment identifié qui pourrait avoir cette fonction est la serglycine. Cette protéine est responsable de l'emballage de protéines dédiées aux lysosomes sécrétoires telles les défensines, les élastases et la lysozyme [88, 89]. Serglycine peut par ailleurs servir d'intermédiaire pour le transport des enzymes lysosomales en servant de pont entre elles et les MPRs [90].

Figure 1.4 Transport par les récepteurs de mannose-6-phosphate



(Tiré de Coutinho et al., 2011, Mol. Genet. Metab.) [91]

1.4 Le transport vers l'endosome

1.4.1 Les motifs de tri

Les récepteurs de tri vers l'endosome possèdent tous une queue cytoplasmique leur permettant de recruter les partenaires nécessaires pour le transport de leurs cargos. Les protéines transmembranaires du lysosome possèdent aussi cette capacité de recrutement afin de ce rendre à bon port [75]. La reconnaissance des récepteurs par ces partenaires est possible grâce à la présence de séquences d'acides aminés dans leurs domaines cytosoliques. Pour CI-MPR la séquence reconnue est -DDSDEDLL- [92] et dans CD-MPR cette séquence est -EESERDDHLL- [93]. La présence du motif répété de leucines dans ces séquences présentent dans tous les récepteurs incluant sortilin [94] a mené à leur appellation de motifs de tri « sorting motifs » dileucine. Le motif dileucine est généralement constitué de la séquence d'acides aminés [DER]XXXL[LVI] ou [DE]XL[LI] où les acides aminés entre [] sont interchangeables [95]. Le motif dileucine est reconnu par les « Golgi-associated γ -ear containing arf-binding proteins » (GGA) qui permettent la formation de vésicules enrobés de clathrine [96].

Un second motif situé sur la queue cytosolique des récepteurs est le motif tyrosine constitué de la séquence d'acides aminés YXX Φ (où Φ =L, M, V, I ou F) ou NPXY [97]. Ce motif est aussi reconnu par le complexe de protéines adaptatrices hétérotétramérique 1 (AP-1)

qui est associé à la clathrine [98, 99]. Ces motifs ne sont pas uniquement présents sur les récepteurs de tri vers le lysosome mais sur plusieurs protéines transmembranaires circulant à travers les différents compartiments intracellulaires.

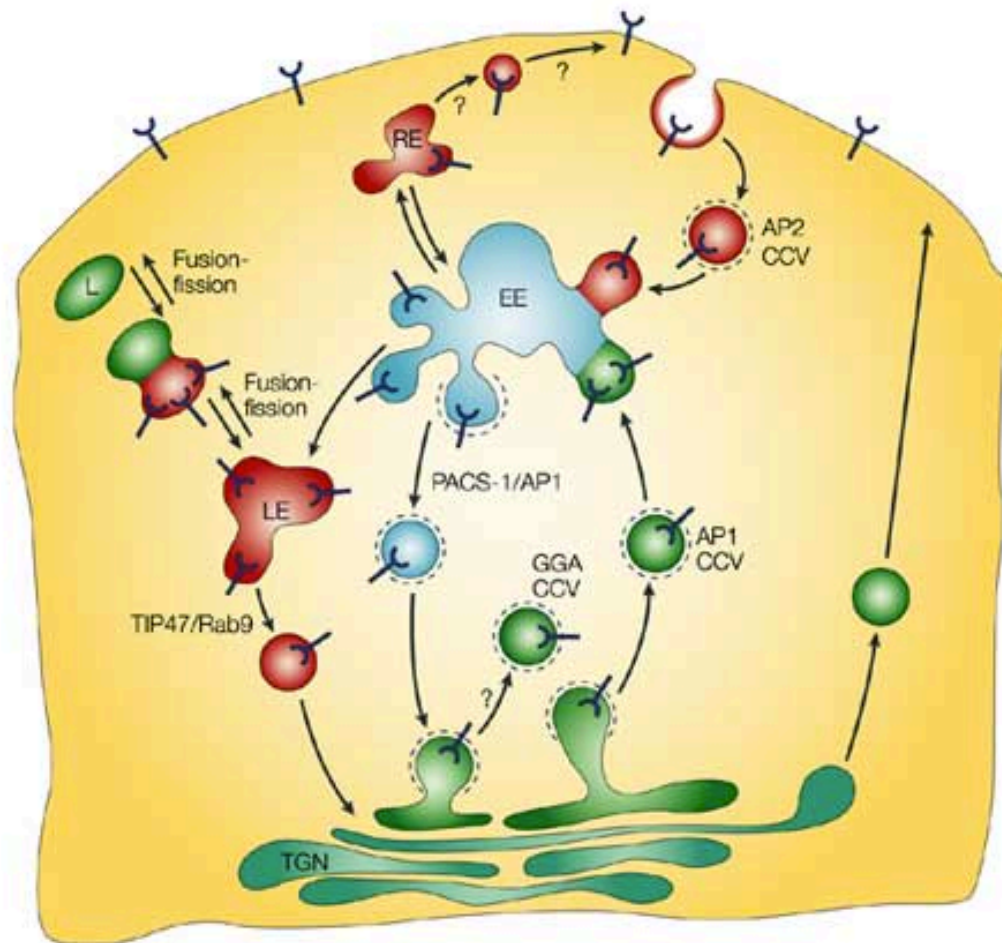
1.4.2 La formation de vésicules

Comme mentionné plusieurs fois jusqu'à présent les récepteurs de tri au lysosome lient des protéines adaptatrices dans le cytosol afin de former des vésicules pour livrer leur cargo aux endosomes. La formation de ces vésicules s'effectue en trois étapes : le recrutement des protéines d'échafaudage, la courbature de la membrane et la scission des vésicules.

L'activation des GTPases « adenosine diphosphate (ADP)-ribosylation factor » (Arf) amorce le bourgeonnement de vésicules. Lorsque Arf1 est activé les GGA sont recrutés à la membrane du TGN grâce à leur domaine GAT. Le domaine VHS des GGA peut alors reconnaître le motif dileucine de la queue cytosolique des récepteurs de tri vers le lysosome. Par la suite, les GGAs en combinaison avec Arf1 et la présence sur membrane du TGN de phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) recrutent le complexe AP-1 qui participe à la formation des vésicules [100]. Les GGA sont partiellement remplacées par le complexe AP-1 qui participe au recrutement de l'enthoprotine et de la clathrine. Ces protéines courbent la membrane et concentrent les récepteurs dans la vésicule en formation. Le complexe Rabaptin5/Rabex5 est aussi recruté pour ensuite permettre le recrutement de Rab5 qui permet le ciblage des vésicules vers l'endosome. P56 et la γ -synergine sont ensuite recrutés pour permettre l'interaction avec le cytosquelette. Finalement, la dynamine, grande GTPase, est

responsable de la fission des vésicules de transport [75, 100-102] (Figure 1.5). Les vésicules concentrées en protéines dédiées au lysosome se rendent ensuite à l'endosome où le pH plus acide qu'au Golgi cause la relâche des enzymes dédiées au lysosome par les récepteurs de tri (Figure 1.4) [51].

Figure 1.5 La formation de vésicules



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

(Tiré de Gosh et al., 2003, Nat. Rev. Mol. Cell Biol.) [75]

1.5 Le recyclage des récepteurs de tri au lysosome

1.5.1 Le complexe retromer

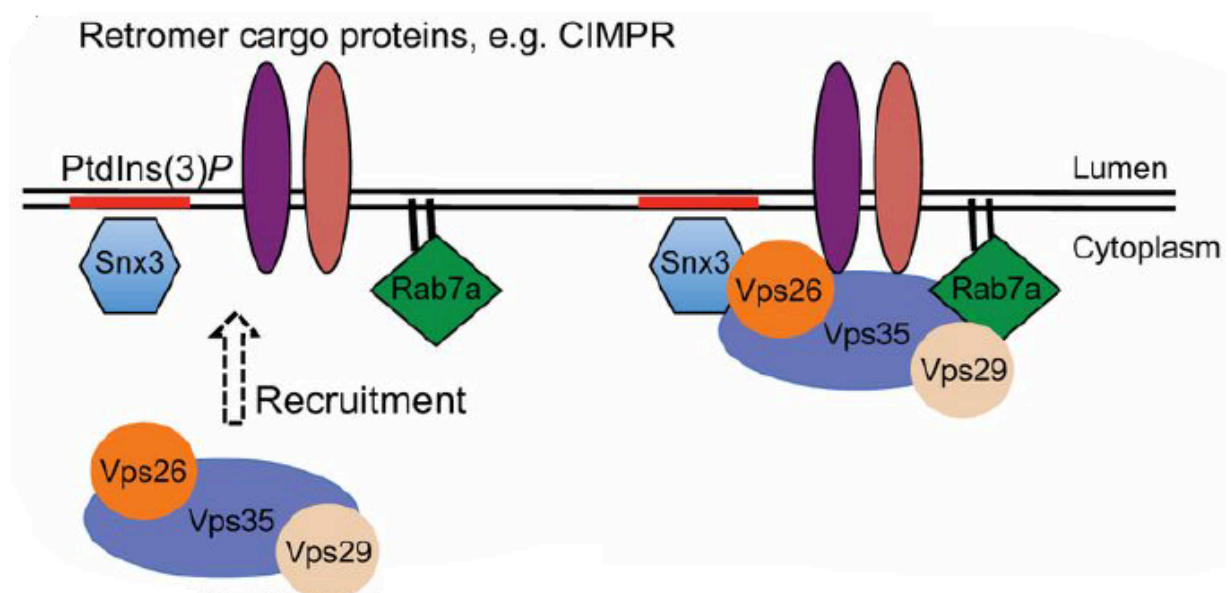
Une fois que les récepteurs ont relâché les enzymes lysosomales ils peuvent suivre 2 voies distinctes : suivre leur cargo vers le lysosome où ils seront dégradés ou être recyclés vers l'appareil de Golgi afin de poursuivre le transport des enzymes lysosomales. Le mécanisme qui détermine le sort des récepteurs est encore très peu connu mais nous savons que leur recyclage est effectué par un complexe protéique nommé retromer [103, 104].

Le complexe retromer fût d'abord découvert chez la levure lors de l'étude du mécanisme de recyclage de Vps10p, l'homologue de sortilin [105]. Retromer peut être subdivisé en deux sous-complexes qui s'assemblent séparément et interagissent de manière transitoirement [106]. Le premier sous-complexe est conservé de la levure aux mammifères et est composé des protéines de tri vacuolaire « vacuole protein sorting » (Vps) Vps26, Vps29 et Vps35 [104, 107]. Le trimère Vps26-Vps29-Vps35 est responsable de la reconnaissance des récepteurs et autres protéines transmembranaires qui constituent le cargo et est donc aussi connu sous le nom de complexe cargo-sélectif (CSC) [108]. Le deuxième sous-complexe est constitué de nexines de tri « sorting nexins » (Snx). Chez la levure les Snx composant retromer sont Vps5p et Vps17p [109]. Ce sous-complexe n'est par contre pas conservé chez les mammifères où il peut être composé d'un homologue de Vps5p : Snx1 et Snx2 qui

dimérise avec un orthologue de Vps17p : Snx5 ou Snx6 [110]. Les Snx composant retromer sont responsables de la liaison à la membrane du complexe ce qui est accompli par leur domaine « Bin/Amphiphysin/Rvs » (BAR) d'où leur nom plus spécifique (SNX-BAR) qui les distingue des autres nexines [111].

La formation des vésicules de recyclages par retromer est sous le contrôle d'une autre nexine Snx3 qui ne possède pas de domaine BAR mais qui s'associe à la membrane de l'endosome grâce à un domaine PX qui reconnaît le phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P [112] et qui agit avec l'aide d'une GTPase nommée Rab7 [113, 114] (Figure 1.6). Bien que plusieurs travaux aient démontré l'importance de Rab7 pour le recrutement de retromer, les mécanismes de reconnaissance et d'activation de cette GTPase étaient jusqu'à présent peu connus.

Figure 1.6 Le complexe retromer



(Tiré de Seaman, 2012, J. Cell Sci. 2012) [115]

1.6 Les GTPases « ras-like in rat brain »

1.6.1 Historique

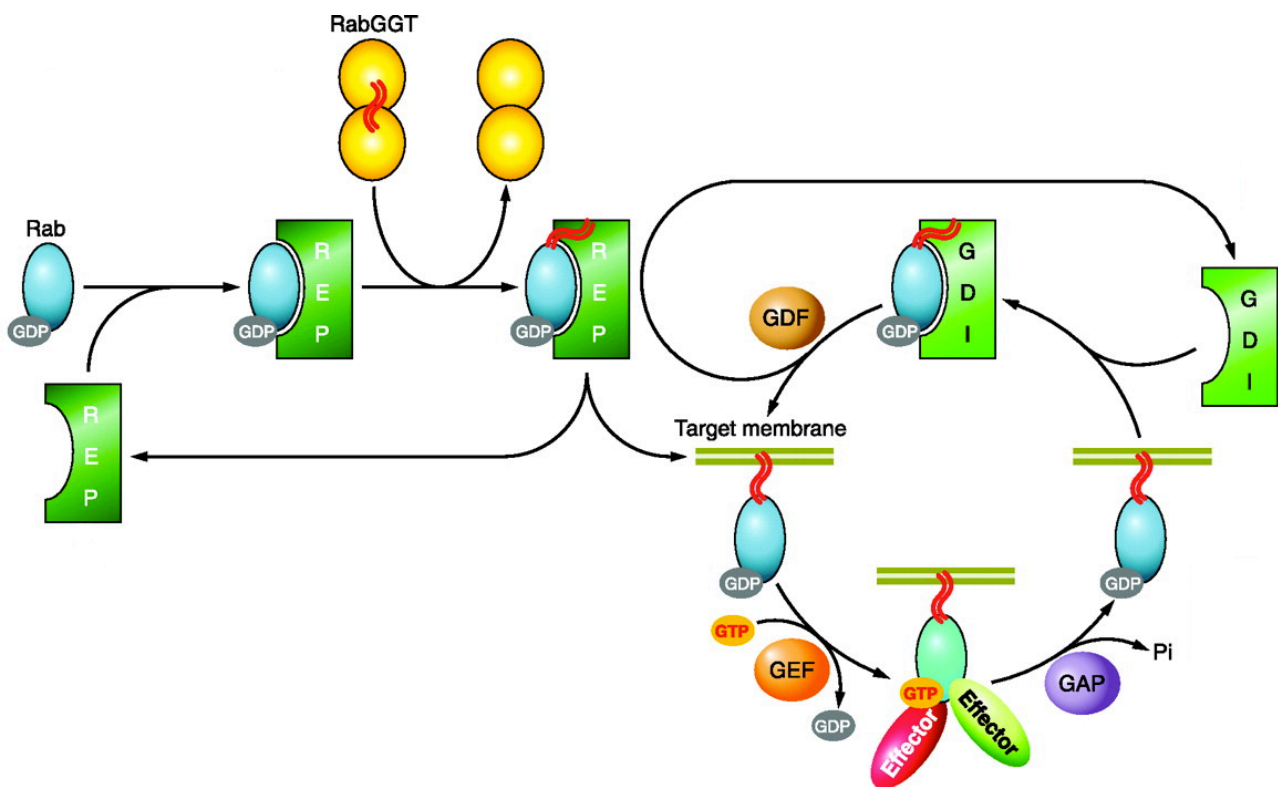
Les protéines « ras-like in rat brain » (Rabs) sont des GTPases faisant partie de la superfamille des Ras. Depuis leur découverte en 1987 [116] on en dénombre 70 chez l'homme et la plupart dans elles jouent un rôle dans la formation des vésicules qui circulent entre les différents compartiments de la cellule. Comme les Rabs sont localisés spécifiquement aux compartiments où ils ont une fonction, ils sont souvent utilisés comme marqueurs des différents compartiments cellulaires.[117, 118] La plupart des Rabs sont exprimées de manière ubiquitaire mais certaines ont des profils d'expressions spécifiques à certains types cellulaires.

1.6.2 Mécanisme

Comme toutes les GTPases les Rabs sont présents sous formes inactives liées au GDP dans le cytoplasme. Sous cette forme, les Rabs sont liés lorsqu'ils sont nouvellement synthétisés à la « Rab escort protein » (REP) [119] ou après leur dissociation de la membrane à la « guanine-nucleotide-dissociation-inhibitor » (GDI) afin de les maintenir inactifs [120, 121]. Après leur recrutement à la membrane des compartiments où elles sont nécessaires la GDI est retirée par un facteur de dissociation du GDI (GDF) [122] et leur molécule de GDP est échangée pour une molécule de GTP afin de les activer. Cet échange est sous le contrôle

d'une « guanoside exchange factor » (GEF) [123]. L'échange d'un GDP pour un GTP cause un changement de conformation permettant aux Rabs de lier leurs protéines effectrices et d'accomplir leurs fonctions [124]. Une fois leur fonction accomplie la molécule de GTP est hydrolysée avec la participation d'une « GTPase activating protein » (GAP) [123]. La protéine Rab désactivée est ensuite recouplée au GDI et à nouveau dissociée de la membrane [125] (Figure 1.7).

Figure 1.7 Le cycle d'activation des Rabs



(Tiré de Hutagalung *et al.*, 2011, *Physiol. Rev.*) [126]

1.6.3 Rab7

Rab7 est la GTPase de la famille Rab agissant au niveau de l'endosome et du lysosome. Cette GTPase est impliquée dans la biogénèse des lysosomes par son action dans la maturation des vésicules d'endocytose, de phagocytose et d'autophagocytose [127, 128]. Rab7 est aussi impliqué dans le transport de l'endosome vers le lysosome et comme découvert plus récemment dans le transport de l'endosomes vers le réseau trans-golgien [113, 114].

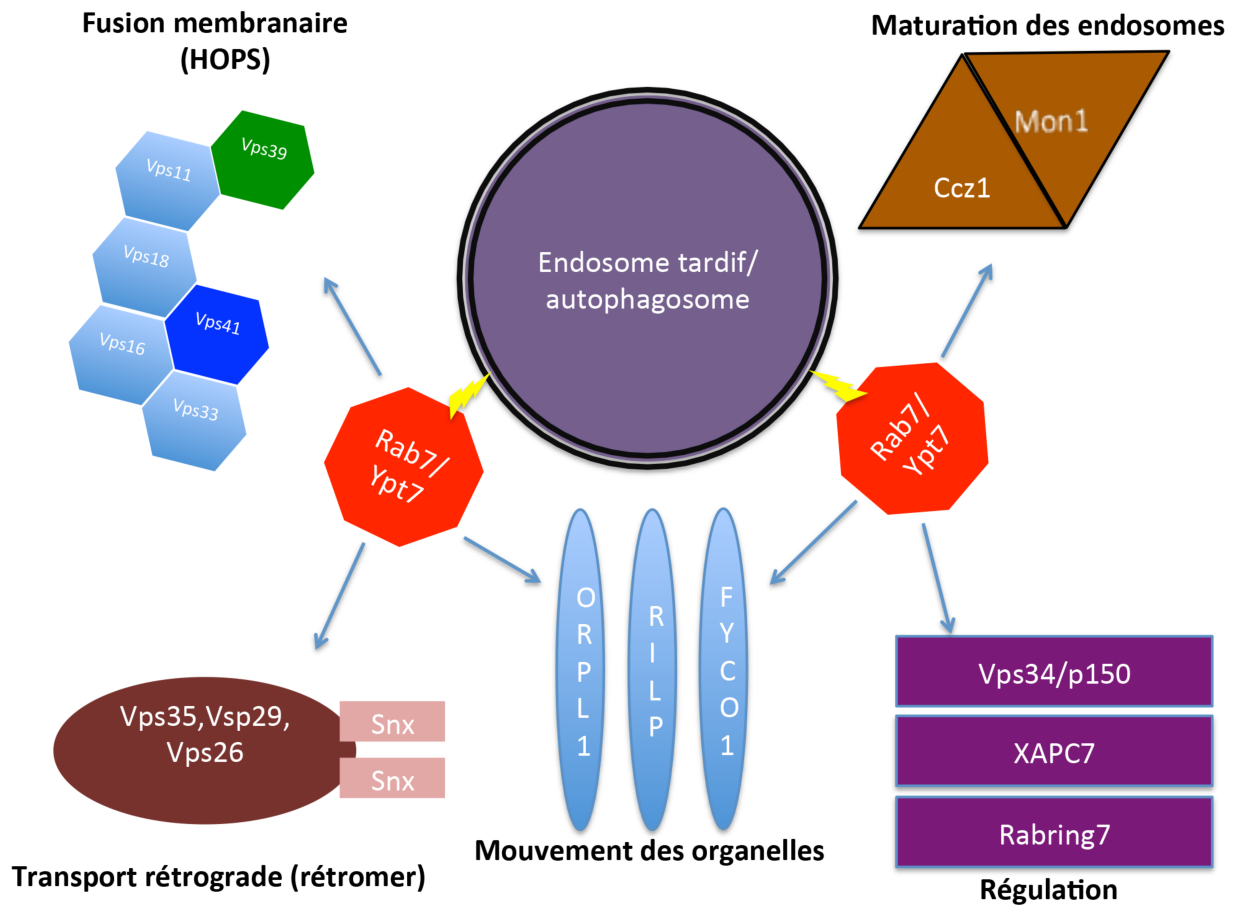
On retrouve relativement peu d'information dans la littérature sur les différentes protéines pouvant interagir avec Rab7 en amont de son activation afin qu'elle puisse accomplir ces différentes fonctions. La GEF permettant d'activer l'homologue de Rab7 dans la levure, Ypt7, a récemment été identifié comme étant le complexe Mon1-Ccz1[129]. Des études chez la plante ont aussi démontré son activité de GEF [130] mais son rôle chez les mammifères n'a pas encore été démontré. Deux GAP procédant à l'inactivation de Rab7 ont aussi récemment été identifiés : TBC1D15 [131] qui possède une forte homologie avec la Gyp7, la GAP de Ypt7 [132] chez la levure et TBC1D5 [113].

Rab7 fonctionne dans de nombreux processus cellulaires. Cette GTPase est impliquée dans le transport des lipides, le positionnement des autophagosomes et la dégradation dans le protéasome. Au niveau des endosomes tardifs, Rab7 régule leur formation, maturation, composition membranaire, positionnement et leur fusion aux lysosomes. Finalement Rab7 est aussi impliquée dans le recyclage des récepteurs de tri vers le lysosome [133]. C'est en

recrutant une grande variété d'effecteurs que Rab7 effectue ces diverses fonctions (Figure 1.8). La « rab7-interacting lysosomal protein » (RILP) et ORP1L contrôle le positionnement des endosomes tardifs et des autophagosomes en réponse au cholestérol et le transport vers les lysosomes [134]. Plus récemment la « FYVE and coiled-coil domain containing protein 1 » (FYCO1) a été identifiée comme responsable du positionnement des compartiments en période de carence [135]. La dégradation dans le protéasome semble être aussi d'une certaine façon régulée par Rab7 car la sous-unité XAPC7 est aussi un effecteur de Rab7 qui lorsque surexprimée empêche la formation d'endosomes tardifs [136]. Le PI-3-P qui est reconnu par SNX3 (section 1.5.1) est généré par la PI-3-kinase VPS34 qui est aussi un effecteur de Rab7 [137]. L'interaction entre VPS34 et Rab7 pourrait avoir un rôle encore inconnu dans la maturation de l'endosome précoce à l'endosome tardif [133]. Le processus de fusion des vésicules de l'endosome tardif avec le lysosome est aussi sous le contrôle de Rab7 et pour ce processus le complexe HOPS agit comme complexe d'ancrage [138]. Finalement le rôle de Rab7 dans le recyclage des récepteurs de tri vers l'endosome est accompli par le recrutement du complexe retromer [113, 114].

Toutes ces fonctions de Rab7 requiert une manière de sélectionner les effecteurs séparément les uns des autres. Ainsi un mécanisme de régulation de Rab7 en amont de son activation doit exister pour différencier les effecteurs qui seront recrutés. La GDF inconnu pourrait servir de régulateur pour Rab7 mais une autre possibilité existe résidant dans une modification posttraductionnelle des GTPases qui est la lipidation.

Figure 1.8 Protéines effectrices de rab7



(Données tiré de Nordmann *et al.*, 2012, Rab GTPases and Membrane Trafficking) [133]

1.7 Les types de lipidations

Il existe plusieurs formes de lipidations des protéines qui permettent de réguler leur localisation, leur fonction et leur stabilité (Figure 1.9). Cette thèse ne discutera pas en détails de toutes les formes de lipidations mais seulement de celles observées jusqu'à présent sur les GTPases de la famille Rab.

Figure 1.9 Les types de lipidations

Modification	Modifying Group
S-Palmitoylation	
N-Palmitoylation	
N-Myristoylation	
O-Acylation	
Farnesylation	
Geranylgeranylation	
Cholesterol	

(Tiré de Nadolski *et al.*, 2007, FEBS J.) [139]

1.7.1 La prénylation

La prénylation est l'ajout sur une cystéine en C-terminale d'un résidu isoprénoïde de 15 carbones, la farnésylation, ou de 20 carbones, la géranylgeranylation par un lien thioéther (Figure 1.9) [140]. Les GTPases de la famille Ras sont farnésylées sur leur motif nommé « CaaX » et la nécessité de cette modification pour leur fonction oncogénique a grandement augmenté l'intérêt pour cette forme de lipidation [141, 142]. Par contre la forme de prénylation la plus récurrente des Rabs est la géranylgeranylation [143]. Chez les mammifères la farnésyltransférase et la géranylgeranyltransférase sont responsables de la prénylation [144]. Par contre une enzyme spécifique aux Rabs, la Rab géranylgeranyltransférase (RGGT) est responsable de leur modification [145, 146]. Lorsque les Rabs sont traduits dans le cytosol ils sont couplés à la REP qui est une sous-unité de RGGT et qui maintient la GTPase inactive [147, 148] (Figure 1.7). La RGGT contient deux autres sous-unités. La sous-unité α , RGGTA, possède une forte homologie avec la farnésyltransférase et agit comme interface entre la REP et la sous-unité β , RGGTB. RGGTB quant à elle lie le géranylgeranyl qui sera transféré sur la protéine [145]. La déplétion de RGGTA ou RGGTB est suffisante pour abolir la fonction de l'enzyme. La prénylation est une modification irréversible et la farnésylation ou une mono-géranylgeranylation permet une association très faible à la membrane des compartiments cellulaires [149]. Certaines GTPases pour s'ancrer plus solidement à la membrane subissent donc une autre forme de lipidation, la palmitoylation [150].

1.7.2 La palmitoylation

La palmitoylation consiste en l'addition sur une cystéine d'un résidu d'acide gras de 16 carbones, le palmitate. Il existe deux formes de palmitoylation, la N-palmitoylation et la S-palmitoylation (Figure 1.9).

La N-palmitoylation est retrouvée sur la protéine morphogène Sonic Hedgehog (Shh) [151] et consiste en un lien amide sur sa cystéine en N-terminal qui est irréversible. Cette modification de Shh est essentielle à sa fonction et plusieurs études ont démontré que sa localisation et sa fonctionnalité sont grandement réduites lorsque la cystéine palmitoylée est mutée [152, 153]. L'enzyme spécifiquement responsable de la palmitoylation de Shh est la Hedgehog acetyltransferase (Hhat) [154] dont la délétion cause des défauts de formation du tube neuronal chez la souris [155].

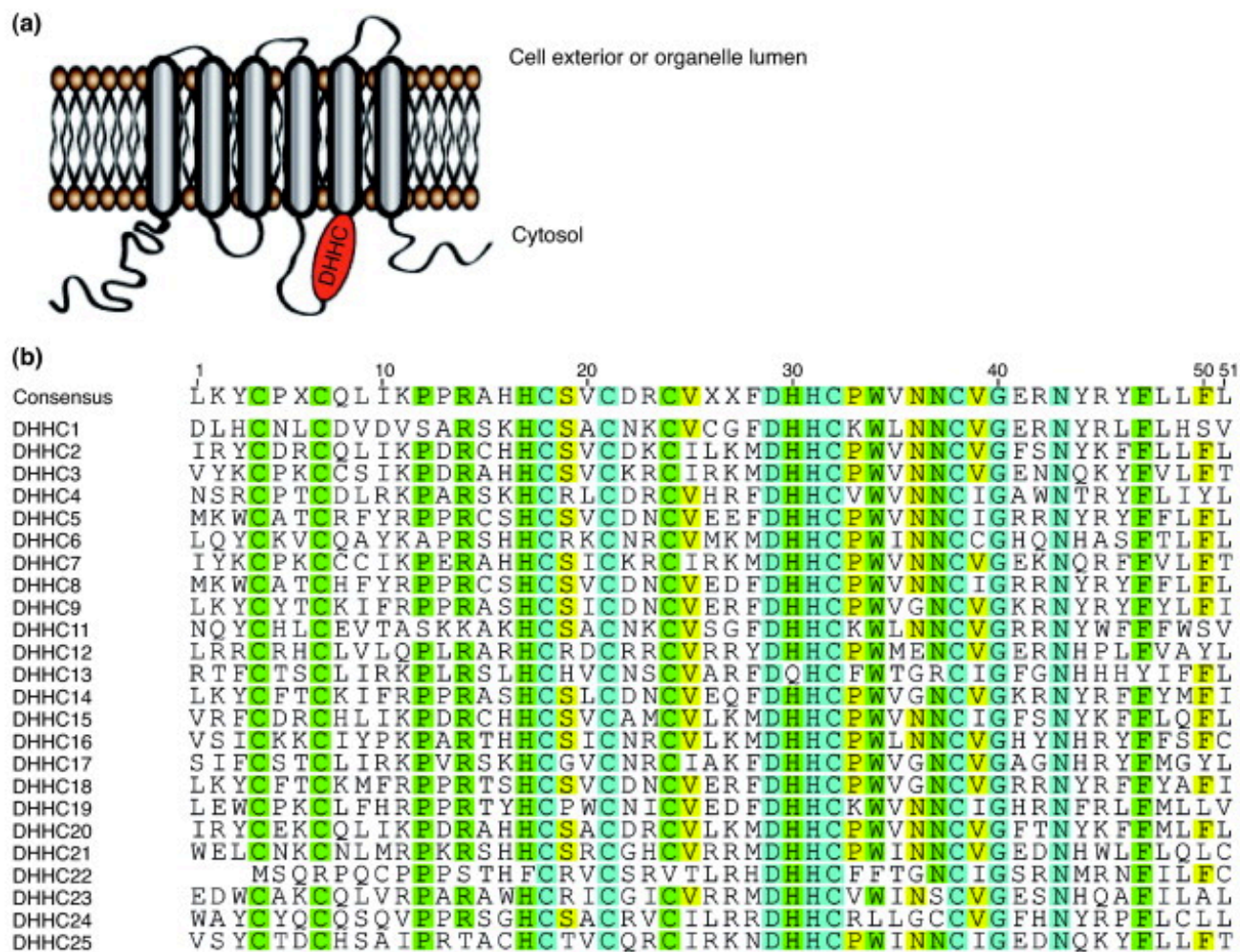
La S-palmitoylation est la forme retrouvée chez toutes les autres protéines palmitoylées jusqu'à présent. Cette modification consiste en un lien thioester réversible sur une cystéine et est retrouvée aussi bien chez des protéines transmembranaires que sur des protéines solubles associées aux membranes. La palmitoylation des protéines transmembranaires a pour effet en plus d'augmenter leur hydrophobicité de réguler leur stabilité et leur dégradation. Dans le cas de sortilin et de CI-MPR par exemple notre équipe a démontré qu'en absence de palmitoylation ces protéines sont dégradées plus rapidement [156]. La palmitoylation de protéines a, comme mentionné précédemment, la capacité d'augmenter l'affinité de leur

attachement aux membranes lipidiques. Plusieurs cas sont décrits pour les GTPases de la famille Ras par exemple où après leur farnésylation l'attachement d'un résidu de palmitate leur permet d'être associé plus fortement et plus longtemps à la membrane [150]. En plus de stabiliser l'attachement à la membrane, la quantité de résidus palmitates présents sur les protéines joue aussi un rôle sur leur localisation. En effet, la palmitoylation double de H-Ras cause son accumulation à la membrane plasmique tandis que la mono-palmitoylation de N-Ras résulte en son accumulation à la membrane de l'appareil de Golgi [157].

La palmitoylation est effectuée par des palmitoyltransférases qui ont d'abord été identifiées chez la levure. Les premières palmitoyltransférases ont été identifiées grâce au fait que la palmitoylation de Ras2 chez la levure est essentielle pour leur survie [158]. Ainsi un criblage de gènes responsables pour la survie des levures a permis de constater que l'absence de 2 protéines baptisées « Effect on Ras » (ERF) Erf2 et Erf4, qui était létal pour les souches étudiées, était accompagnée d'une absence de palmitoylation de Ras2 [159, 160]. Chez les mammifères une large famille de palmitoyltransférases a été identifiée comportant une région conservée riche en cystéines et le motif aspartate-histidine-histidine-cystéine (DHHC) qui est le site-actif de l'enzyme [161, 162]. On dénombre à ce jour 25 membres de la famille des DHHC qui sont des protéines transmembranaires que l'on retrouve dans plusieurs compartiments cellulaires (Figure 1.10) [163]. Il n'existe pas de motif permettant de prédire les sites de palmitoylation comme pour la prénylation et d'autres formes de lipidations. Cependant, la cystéine palmitoylée est souvent adjacente à la région transmembranaire ou à une région comportant déjà une autre modification lipidique [164].

L'aspect le plus intéressant de la palmitoylation est sa réversibilité permettant une association et une dissociation dynamique des protéines solubles à la membrane. Des thioestérases sont responsables de la dépalmitoylation des protéines et jusqu'à présent trois de ces enzymes ont été identifiés chez les mammifères. Les « palmitoyl-protein thioesterase » (PPT) 1 et 2 sont situées dans le lysosomes et des défauts de PPT1, aussi connu sous le nom de CLN1, sont associés à une famille de maladies neurodégénératives (voir chapitre 1.9.3) [165-167]. L'« acyl-protein thioesterase 1 » qui est cytoplasmique quant à elle peut dépalmitoyler H-Ras et certaines protéines-G hétérotrimériques [168]. Vu le grand nombre de protéines palmitoylées identifiées il est fortement possible que d'autres thioestérases soient encore inconnues.

Figure 1.10 La famille DHHC



(Tiré de Greaves *et al.*, 2011, Trends Biochem. Sci.) [163]

1.8 Les maladies lysosomales

Il existe plus de cinquante maladies reliées à un fonctionnement anormal du lysosome. Ces maladies rares sont généralement dues à un défaut génétique. On estime à environ 1 : 5000 le nombre d'individus naissant avec une maladie lysosomale [169]. La sévérité et l'âge d'apparition des symptômes sont souvent reliés à la quantité de fonctions restante de la protéine mutée [170, 171]. Ces maladies ont longtemps été classées selon le type de matériel s'accumulant dans le lysosome. Ce mode de classification a mené à des erreurs dans le passé puisque le type de matériel s'accumulant dans le lysosome pouvait être le même pour des mutations affectant des protéines différentes. Plus récemment ces maladies ont donc été reclassées selon le type de protéines qui cause l'affection (Tableau I).

1.8.1 Les maladies liées aux enzymes

Le premier groupe est celui dont la déficience principale est celle d'une enzyme lysosomale. La première maladie lysosomale identifiée est la maladie de Tay-Sachs avant même l'identification du lysosome [172, 173]. La maladie de Tay-Sachs est caractérisée par l'accumulation de G_{m2} -gangliosides due à une déficience de l'enzyme β -hexosaminidase A [174].

Une autre des maladies connues de ce groupe est la maladie de Gaucher causée par une déficience en glucocérebrosidase [175]. Cette déficience entraîne une accumulation de glucosylcéramide dans plusieurs organes ainsi que dans les macrophages. Les formes plus sévères mènent à une plus grande susceptibilité aux infections. La maladie de Gaucher a la particularité d'être une des rares maladies lysosomales sans symptômes dans le système nerveux central [176].

1.8.2 Maladies causées par un défaut de modifications post-traductionnelles

Le second groupe contient les maladies causées par un défaut de modification post-traductionnelle de l'enzyme lysosomale. Ce genre de défaut mène à une fonction anormale de l'enzyme. L'exemple le plus connu de ce type de défaut mène à la « multiple sulfatase deficiency » (MSD) où toutes les sulfatases sont déficientes [177]. Cette maladie est due à un défaut de l'enzyme « formylglycine generating enzyme » (FGE) qui est responsable de la transformation d'une cystéine du site actif de toutes les sulfatases en C α -formylglycine [178]. Les sulfatases clivent les esters de sulfites et ont entre autres comme substrats les glycosaminoglycans et les sulfolipides [179]. On retrouve 13 sulfatases chez l'humain et la transformation de la cystéine du site actif des sulfatases est essentielle pour leur fonction. Les mutations des sulfatases individuelles causent différents types de mucopolysaccharidoses et à la leucodystrophie métachromatique tandis que la MSD est une maladie très sévère regroupant les symptômes retrouvés dans toutes les maladies causées par les sulfatases [180].

1.8.3 Maladies causées par un défaut de transport des enzymes

Une mauvaise localisation des enzymes destinées au lysosome cause aussi une accumulation de leur substrat. Ces défauts ne sont pas dangereux pour les autres substrats possibles puisque le pH du cytoplasme n'est pas assez acide pour leur permettre de fonctionner. Les mucopolysaccharidoses de types II et III sont les mieux connues de ce groupe. Elles sont causées par un défaut de l'enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase qui phosphoryle les enzymes lysosomales [44]. Les enzymes non-phosphorylées ne peuvent alors plus être reconnues par les récepteurs de tri vers le lysosome. Les enzymes n'étant plus séquestrées dans la voie vers le lysosome elles se retrouvent dans la voie sécrétoire et dans le milieu extracellulaire. Ce défaut cause leur sécrétion dans le milieu extracellulaire.

1.8.4 Maladies causées par un défaut d'une protéine membranaire non-enzymatique

Plusieurs protéines transmembranaires sont présentes au lysosome et leur fonction n'est pas toujours connue [181]. Malgré le fait que les « Lysosomal-associated protein » (LAMP) LAMP1 et LAMP2 représentent 50 % des protéines à la membrane du lysosome leurs fonctions exactes demeurent inconnues. Par contre les mutations des gènes de ces protéines causes la maladie de Danon, une cardiomyopathie fatale où l'on retrouve une accumulation de vésicules autophagiques dans le tissu cardiaque et squelettique [182].

Le syndrome de Niemann-Pick de type C (NPC) qui est aussi beaucoup étudié présente des fibroblastes ayant une accumulation de cholestérol non-estérifié. Cette maladie est causée par les mutations des gènes NPC1 et NPC2 dont les produits sont des protéines transmembranaires du lysosome dont la fonction exacte est inconnue [183-185].

1.8.5 Maladies causées par un défaut d'une protéine non-enzymatique soluble

Plusieurs protéines présentes dans le lysosome n'ont pas d'activité enzymatique mais sont pourtant nécessaire à sa fonction en servant parfois de cofacteurs d'enzymes par exemple. C'est le cas entre autres de l'activateur de Gm2 gangliosides qui agit avec la β -hexosaminidase A. Les mutations du gène GM2A causent la GM2 ganglisidose de type AB qui présentent une accumulation de gangliosides GM2 et de glycolipides GA2 [186, 187]. La variante A de la maladie de Gaucher qui est causée par des mutations de la saposine est un autre exemple de ce genre de maladie. La saposine C est un produit de clivage de la prosaposine qui est un cargo du récepteur de tri vers le lysosome sortilin [79].

Tableau I. Les maladies lysosomales

Disease category	Disease	Deficiency
Primary lysosomal hydrolase defect	Gaucher disease	Glucosylceramidase
	GM1 gangliosidosis	GM1- β -galactosidase
	Tay–Sachs disease	β -Hexosaminidase A
	Sandhoff disease	β -Hexosaminidase A and B
	Fabry disease	α -Galactosidase A
	Krabbe disease	β -Galactosyl ceramidase
	Niemann–Pick disease types A and B	Sphingomyelinase
Post-translational processing defect of lysosomal enzymes	Metachromatic leukodystrophy	Arylsulphatase A
	Mucosulphatidosis	Multiple sulphatase
Trafficking defect for lysosomal enzymes	Mucopolipidosis types II and IIIA	<i>N</i> -acetyl glucosamine phosphoryl transferase
Defect in lysosomal enzyme protection	Galactosialidosis	Protective protein cathepsin A (β -galactosidase and neuraminidase)
Defect in soluble non-enzymatic lysosomal proteins	GM2 activator protein deficiency, variant AB	GM2 activator protein
	Sphingolipid activator protein deficiency	Sphingolipid activator protein
	Neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN5)	CLN5 (function unknown)
Transmembrane (non-enzymic) protein	Danon disease	Lysosome-associated membrane protein 2
	Niemann–Pick disease type C (NPC)	NPC1 and NPC2
	Salla disease (free sialic acid storage)	Sialin
	Juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN3, Batten disease)	CLN3 (function unknown)

(Tiré de Jeyakumar *et al.*, 2005, Nat. Rev. Neurosci.)[188]

1.9 Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales

Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales (NCL) composent une sous-famille des maladies lysosomales. Ce sont les maladies neurodégénératives infantiles les plus communes [189] avec une incidence de 1 : 12 500 dans la population mondiale [190]. On retrouve à ce jour près de 200 mutations dans 13 gènes menant aux diverses variantes de NCL [191] nommés CLN1-CLN14 (le gène de CLN9 n'a pas encore été localisé) (Tableau I.2). Malgré la diversité des types de protéines encodées par les NCL les patients présentent des symptômes et des caractéristiques physiologiques similaires. On retrouve toujours chez ceux souffrant de ces maladies de la rétinopathie, des troubles moteur, de l'épilepsie et de la régression cognitive [189]. Les caractéristiques principales amenant à identifier une maladie comme étant une variante de NCL est la présence de lipopigments céroïdes autofluorescents dans les neurones et les tissus périphériques ainsi que la neurodégénérescence [192]. Bien qu'une classification selon le type d'enzyme ait été proposée [193] le mode classique sera utilisé ici pour simplifier la lecture en lien avec les articles (Tableau II).

Tableau II. Les NCL

Maladie (Nouvelle nomenclature)	Éponyme	Phénotype clinique	Abbréviation (Ancienne nomenclature)	Chromosome	Gène	Protéine
CLN1	Haltia-Santavuori	Infantile classique, infantile tardive, juvénile, adulte	INCL	1p32	<i>ppt1/cln1</i>	PPT1
CLN2	Jansky-Bielschowsky	Infantile tardive classique, juvénile	LINCL	11p15	<i>tpp1/cln2</i>	TPP1
CLN3	Spielmeyer-Sjögren-Vogt	Juvénile	JNCL	16p12	<i>cln3</i>	CLN3
CLN5	Variante infantile tardive finlandaise	Infantile tardive, adulte	vLINCL	13q22	<i>cln5</i>	CLN5
CLN6	Lake-Cavanagh ou variante infantile tardive indienne	Variante juvénile précoce ou infantile tardive	vLINCL	15q21-23	<i>cln6</i>	CLN6
CLN6	Kufs type A	Adulte	ANCL	15q21-23	<i>cln6</i>	CLN6
CLN7	Variante infantile tardive turque	Variante infantile tardive	vLINCL	4q28.1-28.2	<i>mfSD8/cln7</i>	MFSD8
CLN8	Epilepsie de Northern/EPMR	EPMR, variante infantile tardive	vLINCL	8p32	<i>cln8</i>	CLN8
?	Variante infantile tardive	Variante infantile tardive	vLINCL	?	?	?
?	Variante juvénile	Variante juvénile CLN9	vJNCL	?	?	?
CLN10	Congénitale	Congénitale classique, infantile tardive, adulte	CNCL	11p15.5	<i>ctds/cln10</i>	Cathepsine D
?	Kufs type B	Adulte	ANCL	?	?	?
?	Adulte	Adulte	ANCL	?	?	?
CLN4	Parry	Dominante autosomale adulte	ANCL	20q13.33	<i>dnajc5/cln4</i>	CSP α
?	?	Dominante autosomale adulte	ANCL	?	?	?

(Données tirées de Williams *et al.*, 2012, Neurology) [193]

1.9.1 Les NCL adultes

La NCL adulte (ANCL) est l'une des variantes les plus rares de cette maladie. La forme la plus connue de cette variante est celle causée par des mutations du gène encodant CLN6 et est aussi connue sous le nom de maladie de Kauf de type A [194]. Les lipopigments étant restreints uniquement aux neurones rend cette maladie difficile à diagnostiquer car une biopsie du cerveau est souvent nécessaire. CLN6 encode une protéine transmembranaire localisée dans le réticulum endoplasmique dont la fonction est inconnue [195].

1.9.2 Les NCL juvéniles

La variante juvénile des NCL (JNCL) est la forme la plus connue et la plus étudiée des NCL. Les mutations du gène encodant CLN3 aussi nommée Battenine causent cette maladie aussi appelée maladie de Batten [196]. Les JNCL présentent des symptômes entre 5 et 10 ans dont le premier est habituellement une perte de la vision. Les patients subissent ensuite une perte des fonctions cognitives et motrices progressive accompagnée d'épilepsie et de troubles psychiatriques [197].

CLN3 est une protéine de 438 acides aminés avec six passages transmembranaires dont les deux extrémités se retrouvent dans le cytoplasme [198, 199]. La protéine est localisée à l'endosome et au lysosome dans les neurones mais aussi à l'appareil de Golgi et la membrane

plasmique lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules non-neuronales [200, 201]. Parmi les fonctions proposées de CLN3 on retrouve des rôles dans l'acidification du lysosome, la fusion membranaire, le transport de vésicules, l'autophagie et l'apoptose [202, 203].

1.9.3 Les NCL infantiles et infantiles tardives

Les NCL infantiles (INCL) apparaissent dès la première année de vie et les enfants en souffrant meurent généralement avant l'âge de 10 ans [204]. Des mutations du gène *cln1*, qui encode la thioestérase PPT1 déjà décrite précédemment (voir chapitre 1.7.2), peuvent causer une forme de INCL [205]. La conséquence sévère des mutations de PPT1 observée est probablement dû à la perte d'activité enzymatique de la protéine menant à plusieurs effets secondaires causés par des protéines palmitoylées [206].

Les NCL infantiles tardives (LINCL) se développent vers l'âge de 2 à 4 ans. Elles peuvent être causées par des mutations du gène *cln2* qui encode la tripeptyl peptidase 1 (TPP1) [207]. Cette enzyme lysosomale enlève des tripeptides de l'extrémité N-terminale des polypeptides [208]. Il est à noter que TPP1 est surexprimé dans les JNCL, notamment la maladie de Batten causée par CLN3 [209].

La variante finlandaise de LINCL ($vLINCL_{Fin}$) est causée par des mutations du gène encodant la protéine CLN5. Cette protéine est synthétisée en un polypeptide de 407 acides

aminés qui contient un domaine transmembranaire [210]. Des études *in vitro* initiales ont émis l'hypothèse que les quatre méthionines en N-terminale de CLN5 pouvaient séparément servir de site d'initiation de la traduction pouvant produire 4 formes de la protéine ayant des poids de 37 kDa à 47 kDa [211]. Les premières études localisaient aussi CLN5 principalement au lysosome et la nature de la protéine mature était initialement controversée car différentes expériences la décrivaient comme une protéine transmembranaire ou soluble selon la méthode utilisée [212, 213]. Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré une interaction entre CLN2, CLN3 et CLN5 ce qui constitue la seule interaction connue entre des protéines impliquées dans la NCL [211]. Les personnes ayant des mutations de CLN5 présentent des symptômes entre 4 et 7 ans et le décès survient entre 14 et 35 ans [214, 215]. La mutation la plus répandue présente dans la population finlandaise est une délétion de deux paires de bases produisant une protéine tronquée CLN5Y392* [216]. Des modèles murins CLN5^{-/-} présentent une perte de vision à cinq mois ainsi que d'autres troubles neurologiques mineurs [189]. Jusqu'aux travaux présentés dans cette thèse aucune fonction de CLN5 n'avait été décrite.

1.10 Traitements des maladies lysosomales

Différentes méthodes ont été utilisées dans le passé pour traiter les maladies lysosomales. Entre autres, l'injection d'enzymes exogènes, la transfusion de plasma ou la greffe de fibroblastes de la peau ont été tenté sans grand succès. De nos jours quelques nouvelles méthodes ont démontré une certaine efficacité.

1.10.1 La greffe de moelle osseuse

Les premières greffes de moelle osseuse dans le but de traiter une maladie lysosomale furent essayées en 1980 pour traiter la mucopolysaccharidose de type I aussi nommée syndrome de Hurler [217]. Ce traitement repose sur la reconstitution chez le patient de monocytes capables d'infiltrer les organes et de se différencier en macrophages. Les macrophages peuvent ensuite sécréter l'enzyme déficiente qui sera endocytée par les tissus et livrer aux lysosomes. Depuis le développement de ce traitement des critères pour assurer de meilleures chances de succès ont été établis. Notamment, la greffe doit être faite sur des patients de moins de 3 ans qui ont une bonne compatibilité avec les donneurs [218].

1.10.2 La thérapie enzymatique de substitution

La thérapie par enzymatique de substitution (ERT) consiste à remplacer l'enzyme défectueuse de la maladie lysosomale ciblée. Bien que l'idée ait été avancée dès la découverte des bases moléculaire des maladies lysosomales, ce n'est qu'avec les avancements dans le domaine de la biologie moléculaire et la conception de protéines recombinantes que la fabrication d'enzyme en quantité suffisante pour être thérapeutique a été possible. Le syndrome de Gaucher de type I est la première maladie lysosomale traitée par ERT. Le traitement utilise l'imiglucérase, une β -glucocérébrosidase recombinante ayant un résidu de mannose 6-phosphate exposé qui est administrée par voie intraveineuse. Ce traitement s'est avéré efficace pour la maladie de Gaucher de type 1 puisque les macrophages qui sont principalement affectés peuvent incorporer par endocytose l'enzyme recombinante dans le sang. Environ 30 % de l'enzyme est aussi rapidement absorbée par le foie et 15 % par la rate. Ce traitement s'est toutefois avéré peu efficace pour les type 2 et 3 de la maladie de Gaucher qui présentent des troubles du système nerveux central [219] Depuis le développement de l'imiglucérase plusieurs maladies lysosomales sont traitées par des enzymes recombinantes avec différents degrés de succès [220].

1.10.3 Limites et autres traitements

La plupart des maladies lysosomales présentent des troubles neurologiques qui peuvent difficilement être traitées par ERT car les enzymes recombinantes ne peuvent pas passer la barrière hémato-encéphalique. C'est un problème d'une grande importance pour les lipofuscinoses céréoïdes neuronales pour lesquelles il n'existe présentement aucun traitement. Dans le cas des maladies lysosomales dont les substrats des enzymes défectueuses sont connus, des thérapies de réduction du substrat en utilisant des molécules pouvant bloquer la synthèse des substrats sont en développement. La molécule utilisée doit cependant être assez petite pour passer la barrière hémato-encéphalique pour être plus efficace que l'ERT [221]. Une autre option envisageable mais très invasive est l'injection intracérébrale directe de l'enzyme [222]. L'ERT est aussi traitement très dispendieux coûtant entre 100 000 \$ et 350 000 \$ par année pour un patient [219].

1.11 Objectifs de la thèse

Le grand nombre de maladies lysosomales connu à ce jour démontre l'importance du bon fonctionnement du lysosome pour la cellule et pour l'ensemble de l'organisme. Chaque étape de la biogénèse de ce compartiment constitue en soit un domaine de recherche pour essayer de comprendre son fonctionnement. Le transport des hydrolases lysosomales qui est sous le contrôle des récepteurs de tri vers le lysosome tels les MPRs et Sortilin est un mécanisme dont la compréhension est très importante car les thérapies de remplacement d'enzymes utilisées jusqu'à présent pour traiter plusieurs maladies lysosomales exploitent ce processus. Ainsi les moyens qu'utilise la cellule pour réguler le cycle de vie des récepteurs méritent d'être bien compris car ils sont potentiellement importants pour s'assurer du bon fonctionnement des traitements.

Objectif général

L'objectif principal de cette thèse est de comprendre les mécanismes permettant le tri efficace des récepteurs devant être recyclés vers l'appareil de Golgi une fois que le cargo destiné au lysosome a été relâché. Pour cela nous nous sommes fixé les objectifs spécifiques suivants :

1) Élucider les mécanismes de recrutement à la membrane du complexe retromer qui est responsable du recyclage des récepteurs de tri vers le lysosome. Bien que la composition

de retromer soit connue, la manière dont ce complexe reconnaît les récepteurs de tri vers le lysosome et interagit avec ces derniers n'est pas encore complètement élucidée.

2) Comprendre comment Rab7, la GTPase responsable du recrutement de retromer distingue entre ces multiples fonctions et recrute les effecteurs nécessaires pour le recyclage vers l'appareil de Golgi et le transport vers le lysosome.

3) Comprendre la nature exacte des protéines jouant un rôle dans la sélection et le recyclage des récepteurs de tri vers le lysosome.

Chapitre 2

2. Article 1

Publié dans : Mol Cell Biol. 2012 Mars 19; 32(10) :1855-1866. Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved

“The Role of Ceroid Lipofuscinosis Neuronal Protein 5 (CLN5) in Endosomal Sorting”

**Aline Mamo,^a Felix Jules,^a Karine Dumaresq-Doiron,^a Santiago Costantino,^{a,c} and
Stephane Lefrancois^{a,b}**

Centre de Recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montreal, Canada^a; Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, Canada^b; and Département d'Ophtalmologie et Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Montreal, Canada^c

2.1 Abstract

Mutations in the gene encoding CLN5 are the cause of Finnish variant late infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL), and the gene encoding CLN5 is 1 of 10 genes (encoding CLN1 to CLN9 and cathepsin D) whose germ line mutations result in a group of recessive disorders of childhood. Although CLN5 localizes to the lysosomal compartment, its function remains unknown. We have uncovered an interaction between CLN5 and sortilin, the lysosomal sorting receptor. However, CLN5, unlike prosaposin, does not require sortilin to localize to the lysosomal compartment. We demonstrate that in CLN5-depleted HeLa cells, the lysosomal sorting receptors sortilin and cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CI-MPR) are degraded in lysosomes due to a defect in recruitment of the retromer (an endosome-to-Golgi compartment trafficking component). In addition, we show that the retromer recruitment machinery is also affected by CLN5 depletion, as we found less loaded Rab7, which is required to recruit retromer. Taken together, our results support a role for CLN5 in controlling the itinerary of the lysosomal sorting receptors by regulating retromer recruitment at the endosome.

2.2 Introduction

Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL) diseases represent a group of recessive disorders of childhood characterized by progressive vision loss, seizures, ataxia, deafness, mental retardation, and greatly reduced life span (18, 24). At the cellular level, NCL is characterized by an accumulation of autofluorescent lipopigments with morphological heterogeneity between various forms (12). Several forms of NCL have been identified on the basis of age of onset, progression of disease, and neurophysiological and histopathological findings. These disorders are the result of germ line mutations in at least 10 genes (CLN1 to CLN9 and cathepsin D) (18), but the precise functions of most of these proteins are still unknown, although most encode either soluble or transmembrane proteins localized to either the endoplasmic reticulum (ER) or endosomes-lysosomes.

CLN1 (also known as palmitoyl-protein thioesterase-1 [PPT1]) is a soluble lysosomal palmitoylthioesterase with no known endogenous substrates, but a deficiency in this enzyme causes infant-stage-onset NCL (3). CLN3 is a transmembrane protein that has been shown to have palmitoyl desaturase activity (25) and may play a role in lysosomal acidification, organelle fusion, and apoptosis (28, 29). Mutations in the CLN3 gene cause juvenile NCL, more commonly known as Batten's disease. The exact function of CLN3 is still not fully elucidated; however, it was recently proposed that it affects lysosomal trafficking and sorting in yeast and mammalian cells (9, 23). Moreover, ablation of CLN3 caused an accumulation of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CI-MPR) lysosomal sorting receptor in

the trans-Golgi network (TGN) (23), and that study found a maturation defect of the soluble lysosomal protein cathepsin D, supporting a role for CLN3 in sorting to the lysosomal compartment. Although the function of CLN5 is unknown, germ line mutations in the gene encoding this protein are implicated in Finnish variant late infantile NCL (33). In humans, the CLN5 gene maps to chromosome 13q22, consists of 4 exons spanning 13 kb of genomic DNA, and encodes a protein of 407 amino acids. The predicted amino acid sequence of CLN5 shows no homology to previously reported proteins, and although several studies suggested that CLN5 has at least one transmembrane domain (4, 33, 38), other studies report that it may be a soluble protein (16). Whereas transfection of COS-1 cells with CLN5 cDNA results in the synthesis of a highly glycosylated 60-kDa polypeptide, 47-, 44-, 42-, and 40-kDa polypeptides were produced in cell-free translation assays due to usage of the alternative initiator methionine (17). Finally, previous studies have shown that CLN5 interacts with CLN2 and CLN3 (38) and localizes to the endosomal-lysosomal compartment (17). However, the mechanism cells use to sort CLN5 to lysosomes and the function of this protein remains unknown.

The trafficking of soluble luminal lysosomal cargo such as cathepsin D, CLN1, prosaposin, and β -glucocerebrosidase is sorted by the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (CD-MPR), the cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CI-MPR), sortilin, and LIMP-II (7, 10, 20, 30). For anterograde traffic (Golgi compartment to endosome), cargo binds to the receptors in the Golgi compartment and is packaged into clathrin-coated vesicles (5). When the receptor-cargo complex reaches the more acidic environment of the endosomes, the cargo dissociates from the receptor and the majority of the

receptor is recycled to the Golgi compartment for another round of sorting while a small percentage is degraded in lysosomes (6). The efficient retrograde traffic (endosome to Golgi compartment) of CI-MPR and sortilin requires the retromer protein complex (1, 35). Mammalian retromer comprises 2 distinct subcomplexes: a dimer of a still-undefined combination of sorting nexin 1 (SNX1), SNX2, SNX5, and SNX6 that can interact with the endosomal membrane via phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) and a heterotrimer composed of vacuolar protein sorting 26 (Vps26), Vps29, and Vps35 that can bind the cytosolic tails of the lysosomal sorting receptors (2, 6).

A recent study found that CI-MPR was not implicated in the lysosomal localization of CLN5 (34). We tested the hypothesis that sortilin is involved in the sorting and trafficking of CLN5 to the lysosomal compartment. We report an interaction between CLN5 and sortilin; however, CLN5 was still properly localized in sortilin-depleted cells. Interestingly, in CLN5-depleted cells, we found that CI-MPR and sortilin were degraded in lysosomes due to the lack of retromer recruitment to endosomes. Taking these data together, we propose that CLN5 is part of an endosomal switch that determines whether the lysosomal sorting receptors are recycled to the Golgi compartment or degraded in lysosomes.

2.3 Materials and methods

Antibodies and reagents.

The following mouse monoclonal antibodies were used: anti-CD222 against CI-MPR, anti-myc 9E10, anti-hemagglutinin (anti-HA), and MMS-118P against green fluorescent protein (GFP) (all from Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada) and anti-CD63, anti-SNX1, and Ab-5 against actin (all from BD Bioscience, Mississauga, Ontario, Canada). The following polyclonal antibodies were used: anti-cathepsin D (Cedarlane Laboratories, Burlington, Ontario, Canada), anti-Lamp2 and anti-TGN46 (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), anti-SNX3, anti-AP3, anti-red fluorescent protein (anti-RFP), anti-Vps26, anti-Vps35, and anti-prosaposin (all from Abcam, Cambridge, MA), and anti-CLN5 and anti-CLN1 (both from Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The cDNAs for RFP-Rab5 and RFP-Rab7 were acquired from Addgene (Cambridge, MA). The HA-CLN5 construct was purchased from Genecopoeia (Germantown, MD). pGEX-RILP220-299 was a generous gift from Aimee Edinger (University of California, Irvine, CA). The cDNA for CLN1 and myc-CD63 was purchased from Origene (Rockville, MD). The dominant-active Rab7 (RFP-Rab7Q67L) and the dominant-negative Rab7 (RFP-Rab7T22N) were generated by site-directed mutagenesis. The myc-Rab1a construct was a generous gift from Terry Hebert (McGill University, Montreal, Quebec City, Quebec, Canada).

Cell culture and immunofluorescence.

Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. Transfections were performed using 1 µg of DNA per 4-cm² plate with Lipofectamine reagent supplemented with Plus reagent according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada). Immunofluorescence was performed as previously described (11).

Co-immunoprecipitation.

24 hours after transfection cells were lysed by incubating 30 min in ice-cold TNE buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) and centrifuging at 3000 g for 15 min. Lysates were then incubated overnight at 4 °C with 3 µg of antibodies (against RFP for RFP-Rab5 and RFP-Rab7 and against HA for HA-CLN5). Protein G sepharose beads were then added to the samples and incubated for one hour at 4 °C. The beads were collected by centrifuging the samples at 16 000 g for 30 sec. The beads were then washed with TNE buffer three times for 5 min and Laemmli buffer was added to the samples. Interactions were then detected by immunoblotting. These methods were previously described (19, 21).

Cycloheximide chase.

Cells in culture were treated with 50 µg/mL cycloheximide for various time points before being lysed in TNE buffer (described above).

Glutathione S-transferase (GST) pulldown assay.

E. coli. strain BL21 were transformed with pGEX-RILP₂₂₀₋₂₉₉ and a colony was grown overnight at 37 °C in 10 mL LB/Amp. The following day the 10 mL culture was poured into 1 L of LB/Amp and grown at 37 °C until the OD₆₀₀ was between 0.5 and 0.8. IPTG was then added to 0.1 mM and cells were incubated on a shaker overnight at room temperature. For protein extraction the cells were centrifuged at 5000 g and resuspended in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF and EDTA-free protease inhibitor). The cells were then lysed by sonication and Triton X-100 was added to 1 % before centrifugation at 30 000 g for 20 min at 4 °C. At this point NaCl was added to 1 M along with 1 mL of a 50 % slurry of glutathione-agarose beads prewashed in lysis buffer and the mixture was incubated for 1 h at 4 °C while shaking. The beads were then collected by centrifuging and washed twice in lysis buffer with 1 M NaCl, twice in lysis buffer and 3 times in lysis buffer without Triton X-100 and finally stored at -20 °C in 1 mL of lysis buffer. 50 µL of GST-RILP₂₂₀₋₂₉₉ bound to the glutathione-agarose beads was then added to lysates prepared from HeLa cells transfected with RFP-Rab7 and siRNAs against CLN5 or CLN1. The lysates and beads were incubated at 4 °C for 1 h. The beads were then washed three times in lysis buffer and resuspended in Laemmli sample buffer. Interaction with RFP-Rab7 was then assessed by immunoblotting. A complete step-by-step protocol is available in Vikis *et al.* 2004 [223].

RNA interference.

The small interfering RNAs (siRNAs) against CLN5 and CLN1 were purchased from Invitrogen and transfected using Oligofectamine (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions. The siRNA against the 3' untranslated region (3' UTR) of CLN5 was purchased from IDT DNA (Coralville, IA) and used according to the manufacturer's instructions. Cells were depleted of CLN5 and CLN1 by the use of 100 nM siRNA and grown for 48 h before our assays were performed. To deplete sortilin, HeLa cells were transfected using short hairpin sortilin (shSortilin) and Lipofectamine reagent according to the instructions of the manufacturer (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada).

Quantification of immunofluorescence signals at the endosome.

The endosomal compartment was assumed to consist of fluorescent puncta, most of them of subdiffraction-limit size. Wide-field fluorescence microscopy images were taken using a 63X oil-immersion objective and appropriate dichroics to detect Alexa 594, RFP, or GFP. The exposure time of the camera was chosen in order to avoid saturation and maximize the intensity dynamic range and was kept constant for all images acquired. To accurately analyze the data in a nonbiased way, an algorithm was custom programmed using Matlab (Mathworks), which automatically detects puncta and computes their mean fluorescence intensities in images composed of several cells. Fluorescent puncta were detected using linear band-pass filters that preserved objects of a size window and suppressed noise and large structures. These filters were applied by performing two 2-dimensional convolutions of the image matrix with a Gaussian and a boxcar kernel. First, the image was convolved with a

Gaussian kernel of the characteristic length of the noise component. This is considered a low-pass filter, since only fluctuations longer than that given length are kept after the operation. Second, the image matrix was convolved with a boxcar kernel twice as big as the point spread function. This last operation is a low-pass filter for near-diffraction-limit objects. Finally, the subtraction of the boxcar image from the Gaussian images becomes a band-pass filter to choose elements bigger than those representing noise and up to twice the diffraction limit. In order to limit the puncta considered in the calculation to those inside cells, an intensity threshold was established using Otsu's method (27). The cytosolic fluorescence was enough to allow use of this automatic thresholding procedure to assign foreground pixels to cells and background pixels to empty space. This coarse estimation of signal corresponding to the foreground pixels was further refined and used as a mask to consider only puncta inside cells and discard signal arising from culture debris and nonspecific staining. The first refinement was to clean the mask by removing isolated pixels (1s surrounded by eight 0s). Next, a morphological erosion (13) was performed, and holes inside the mask were filled. Finally, the area of each individual object in the mask was measured, and all objects whose size was less than 50 times that of the biggest object (often several cells close together) were removed. Using the value for the already-filtered image multiplied by the cell mask value, an algorithm that finds local maxima of intensity was applied to detect the brightest pixels. Each of these intensity maxima was considered to represent the brightest location of a puncta, and circles 4 pixels in radius were established around the maxima. For each set of images, the mean intensity was calculated for all those circles as a measure of protein expression level. The program opened all images one by one, performed the band-pass filter, established a mask to

delineate cells, found endosome circles, computed their mean intensity, and calculated the average intensity for all endosomes in the full set of images.

Membrane isolation assay.

24 hours post-transfection, cells were collected, snap frozen with liquid nitrogen and allowed to thaw at room temperature. Samples were resuspended in buffer 1 (0.1 M Mes-NaOH pH 6.5, 1 mM MgAc, 0.5 mM EGTA, 200 μ M sodium orthovanadate, 0.2 M sucrose) and centrifuged at 10 000 g for 5 min at 4°C. The supernatant containing cytosolic proteins was collected (C, cytosolic fraction) and the pellet was resuspended in buffer 2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100) and spun at 10 000 g for 5 min at 4°C. The supernatant containing membrane proteins was collected (M, membrane fraction) for further analysis. Previously described (15, 36).

Photoaffinity labeling.

At 24 h posttransfection, HeLa cells were resuspended in 60 μ l of labeling buffer (10 mM HEPES [pH 7.4], 1 mM MgCl₂, 0.1 mM β -mercaptoethanol) and passed eight times through a 23-gauge needle at room temperature. GTP ($[\gamma]$ 4-azidoanilide 2',3'-biotin-long chain-hydrazone) (Affinity Photoprobes, Lexington, KY) was then added to achieve a final concentration of 0.1 μ M. The samples were then incubated at room temperature for 10 min and were then subjected to UV irradiation (254 nm; 6 mW/cm²) with a mounted lamp for 5 min to cross-link the probe to proteins. Labeling buffer was then added to 750 μ l, and RFP-

Rab7 and RFP-Rab5 were immunoprecipitated using a monoclonal RFP antibody. The labeling reaction was then detected by Western blot analysis using streptavidin-HRP.

2.4 Results

CLN5 interacts with but is not trafficked by sortilin.

Although it is well established that CLN5 localizes to the endosomal-lysosomal compartment (17), few studies have addressed its mechanism of trafficking. A recent study showed that CLN5 was properly localized in CI-MPR-deficient fibroblasts (34), so we tested the hypothesis that CLN5 is a cargo of sortilin. Since soluble cargo must bind a lysosomal sorting receptor, we wanted to determine whether or not CLN5 was an interactive partner of sortilin. To test this, we coexpressed HA-CLN5 and sortilin-myc in HeLa cells and immunoprecipitated CLN5 with anti-HA antibody from HeLa cell lysate (Fig. 2.1A). We observed a specific band corresponding to sortilin-myc in the presence of HA-CLN5 at pH 7 (Fig. 2.1A) that was absent in the bands corresponding to lysates not expressing HA-CLN5, even though sortilin-myc was expressed in both. Similarly, sortilin-myc was able to coimmunoprecipitate HA-CLN5 when we immunoprecipitated with anti-myc antibody (data not shown), and our immunoprecipitation protocol using anti-HA antibody was clean, as seen by using a Coomassie-stained gel (data not shown). Next, we further investigated this interaction to determine whether or not CLN5 is a cargo of sortilin. Earlier studies have established that lysosomal cargo such as prosaposin coprecipitates with the corresponding receptor(s) (in this case, sortilin) when immunoprecipitation experiments are performed at pH

7 but that the same interactions are lost when performed at a more acidic pH (39). We performed a coimmunoprecipitation of CLN5 and sortilin at pH 5 and found that this interaction was pH independent (Fig. 2.1A), as CLN5 bound to sortilin at both neutral pH (Fig. 2.1A) and acidic pH (Fig. 2.1A), suggesting that CLN5 did not behave as a sortilin cargo protein. However, as predicted, the interaction between prosaposin and sortilin was weakened at pH 5 compared to pH 7 (Fig. 2.1A), as prosaposin-myc could not efficiently coimmunoprecipitate sortilin-GFP at pH 5 but could at pH 7. The CLN5-sortilin interaction was specific, as HA-CLN5 was not able to coimmunoprecipitate the myc-CD63 lysosomal membrane protein at either pH level (Fig. 2.1A). To confirm that CLN5 is not a cargo of sortilin, we tested whether or not CLN5 was properly localized to the lysosomal compartment in sortilin-depleted cells. We transfected HeLa cells with short hairpin sortilin (shSortilin) to knockdown sortilin and obtained a 50% decrease in the absolute amount of sortilin following the knockdown (Fig. 2.1B). An immunofluorescence assay performed on mock-depleted cells (Fig. 2.1C, D, and E) and sortilin-depleted cells (Fig. 2.1F, G, and H) showed that CLN5 localization was not affected by the depletion of sortilin (Fig. 2.1F, arrows). It was previously shown that prosaposin did not localize to lysosomes in sortilin-depleted cells (20), and as expected, the localization of prosaposin was perturbed in sortilin-depleted cells (Fig. 2.1H), as shown by the lack of punctuate structures compared to mock-depleted cells (Fig. 2.1E, arrows). On the basis of those data, we concluded that CLN5 is not a cargo of sortilin.

CLN5 is implicated in the trafficking of the lysosomal sorting receptors CI-MPR and sortilin.

Since CLN5 is not a cargo of CI-MPR (34) or sortilin (our data), we examined the biological significance of the CLN5-sortilin interaction. We tested whether or not CLN5 plays a role in the steady-state localization of CI-MPR and sortilin by using siRNA to deplete CLN5 in HeLa cells. We were able to efficiently deplete both CLN5 (Fig. 2.2M, top panels) and CLN1 (Fig. 2.2M, bottom panels) by the use of a pool of 3 siRNAs, as shown by Western blotting. We found that in CLN5-depleted cells (Fig. 2.2J, K, L, J', K', and L'), the intensities of the immunofluorescence signal for endogenous CI-MPR (Fig. 2.2K, star) and sortilin-myc (Fig. 2.2K', star) were greatly reduced compared to mock-treated cell results (Fig. 2.2H and H', arrows). However, the depletion of CLN1 (Fig. 2.2D, E, F, D', E', and F'), a known CI-MPR cargo, did not have an effect on the localization or the intensity of CI-MPR (Fig. 2.2E, arrow) or sortilin-myc (Fig. 2.2E', arrow) compared to mock-depleted cell results (Fig. 2.2B and B', arrows). To verify that the Golgi compartment was still intact in CLN5-depleted cells, we compared the immunofluorescence staining of the Golgi marker giantin in mock-depleted cells to the staining in CLN5-depleted cells. We found no significant differences in giantin staining in mock-depleted (Fig. 2.2N, red) compared to the CLN5-depleted (Fig. 2.2O, red) cells, suggesting that the Golgi compartment was intact in CLN5-depleted cells. However, we found that TGN46 staining was fragmented in CLN5-depleted cells (Fig. 2.2Q, red) compared to mock-depleted cells (Fig. 2.2P, red), which was expected, as a similar phenotype was observed in retromer-depleted cells (35). In retromer-depleted cells, the immunofluorescence staining of CI-MPR is greatly reduced compared to mock-depleted cells, and cycloheximide chase experiments have shown degradation of the receptor in 6 h (1, 31, 35). Since CLN5

depletion resulted in a similar immunofluorescence phenotype, we investigated whether the depletion of CLN5 would lead to the degradation of sortilin and CI-MPR with kinetics similar to the kinetics of retromer depletion. To determine this, we performed a cycloheximide chase experiment; after incubation with cycloheximide for 6 h was performed, we found a notable reduction in expression of CI-MPR (Fig. 2.3A) and sortilin-myc (Fig. 2.3A) in CLN5-depleted cells compared to mock- or CLN1-depleted cells, which showed no significant degradation (Fig. 2.3A). The depletion of CLN5 did not affect the total amount of the endosomal-lysosomal membrane protein CD63 (Fig. 2.3A). Quantification of three separate experiments showed decreases in the levels of CI-MPR and sortilin-myc of 46% and 59%, respectively, in CLN5-depleted cells compared to mock-depleted cells, while we found no significant changes in expression of CD63 (Fig. 2.3B). Notably, the degradation kinetics in CLN5-depleted cells is similar to that seen in retromer-depleted cells (1) or in cells deficient in palmitoylation, which is also required for retrograde trafficking of the lysosomal sorting receptors (21). Since the lysosomal sorting receptors were not being efficiently recycled to the Golgi compartment and were being degraded in CLN5-depleted cells, we would expect the missorting of lysosomal cargo proteins such as cathepsin D or prosaposin. We found an increase in the amounts of precursor and intermediate forms of cathepsin D in CLN5-depleted cells compared to mock-depleted cells (Fig. 2.3C), which is consistent with previously published results from studies performed with cells that had been either Rab7 or retromer depleted (32). Based on these experiments, we concluded that the receptors in CLN5-depleted cells were not recycling to the Golgi compartment but were being degraded in lysosomes, suggesting that CLN5 plays a role in determining the itinerary of the lysosomal sorting receptors at the endosome.

CLN5 is required for the recruitment of Vps26 to endosomes.

We next wanted to determine the mechanism that leads to the degradation of the lysosomal sorting receptors in CLN5-depleted cells. Since retromer depletion leads to a phenotype similar to that seen with CLN5 depletion in terms of both stability and localization of CI-MPR and sortilin, we investigated the effect of CLN5 depletion on the recruitment of retromer to endosomal membranes. We found a notable decrease in the intensity of Vps26 immunofluorescence staining (Fig. 2.4E, star) in CLN5-depleted cells (Fig. 2.4D, E, and F) compared to mock-depleted cells (Fig. 2.4A, B, and C) or CLN1-depleted cells (Fig. 2.4J, K, and L). To rigorously quantify this observation, we developed an ad hoc algorithm to detect endosomes and quantify their fluorescence intensity. We obtained an unbiased image sample by randomly acquiring images from the total cell population. A representative immunofluorescence image is shown (Fig. 2.4M, left panel) along with the mask that the software identifies as representing Vps26-positive structures (Fig. 2.4M, right panel, red circles). This quantification revealed a 50% decrease in Vps26 immunofluorescence staining in the CLN5-depleted cell population (Fig. 2.5A, black bar) compared to mock-depleted cells (Fig. 2.5A, white bar) or CLN1-depleted cells (Fig. 2.5A, gray bar). This observed decrease in endosomal Vps26 intensity could indicate either degradation of the subunit (Vps26) or a block in recruitment of retromer to endosomal membranes. Thus, in order to differentiate between the two possibilities, we performed Western blotting to detect the absolute amount of the retromer subunit Vps26 and found no changes in expression in comparisons of mock-, CLN1-, and CLN5-depleted cells (Fig. 2.5B). To determine whether or not the depletion of CLN5 affected the intensity of immunofluorescence staining in endosomes-lysosomes in general, we compared the results of immunofluorescence staining of CD63. The localization of this protein

to the lysosomal compartment is retromer independent. We found no significant difference in the immunofluorescence staining intensity of CD63 in mock-depleted cells (Fig. 2.5C, white bars) compared to CLN5-depleted cells (Fig. 2.5C, black bars). It has previously been proposed that the Vps26, -29, and -35 trimer is recruited independently of the SNX dimer (22). To gain further insight into the role of CLN5 in the recruitment of retromer to endosomal membranes, we investigated the effect of CLN5 depletion on the recruitment of SNX1 to endosomal membranes. Interestingly, we found no significant changes in the amount of SNX1 recruited to endosomal membranes in CLN5-depleted cells (Fig. 2.5D, black bar) compared to mock-depleted cells (Fig. 2.5D, white bar) by immunofluorescence. To confirm our immunofluorescence data, we performed a membrane isolation experiment to determine the amounts of Vps26, Vps35, AP3, SNX1, and SNX3 in the cytosol and on membranes in mock-, CLN5-, and Rab7-depleted cells. We found less membrane-bound and more cytosolic Vps26 and Vps35 in CLN5- and Rab7-depleted cells compared to mock-depleted cells (Fig. 2.6A). However, we found no change in the distribution of SNX3, which is known to recruit retromer to endosomes to traffic the Wnt-binding protein Wnt-less (15) and blocks the efficient retrograde trafficking of the CD8- CI-MPR chimera (14), or in the distribution of SNX1, while AP3, an adaptor protein complex recruited to endosomes, seemed to be more cytosolic in Rab7-depleted cells whereas CLN5 depletion had no effect (Fig. 2.6A). Lamp2 staining was used to identify the membrane fraction (Fig. 2.6A). The quantification of 3 separate experiments shows the distribution of Vps26 and Vps35 in mock-, CLN5-, and Rab7-depleted cells (Fig. 2.6B). In mock-treated cells, 60% and 70% of Vps26 and Vps35, respectively, were found in the membrane fractions (black bars), whereas in CLN5-depleted cells, the membrane fractions of Vps26 and Vps35 were reduced to 35% and 50%, respectively, and in Rab7-

depleted cells the proportions of membrane association were 35% and 45% for Vps26 and Vps35, respectively. The changes in membrane association of retromer subunits obtained in the CLN5- and Rab7-depleted cells are comparable to those found in previously published reports (15, 36) and support a role for CLN5 in the recruitment of retromer to endosomal membranes.

In order to demonstrate that the effect seen on Vps26 recruitment is specific to CLN5 depletion and not an off-target effect, we adopted a rescue strategy in CLN5-depleted cells. For this, we knocked down endogenous CLN5 by the use of a pool of siRNA directed against the 3' UTR of the designated gene and then reintroduced wild-type CLN5 to test for the rescued phenotype. Using this siRNA strategy, we obtained a 70% reduction in the amount of CLN5 (Fig. 2.7A), which we could rescue with the expression of HA-CLN5 (Fig. 2.7A). The knockdown of CLN5 against the 3' UTR resulted in the decreased recruitment of Vps26 (Fig. 2.7B, black bar) compared to the results seen with mock-treated cells (Fig. 2.6B, white bar). Reintroducing wild-type HA-CLN5 into these CLN5- depleted cells rescued the recruitment of Vps26 (Fig. 2.7B, gray bar). Taken together, these results point to a specific role for CLN5 in influencing the trafficking of lysosomal sorting receptors by controlling recruitment of retromer to endosomal membranes.

CLN5 regulates the localization of Rab7.

Next, we attempted to identify the molecular mechanisms by which CLN5 controls the recruitment of retromer to endosomes. Recently, it was shown that activation of the small G proteins Rab5 and Rab7 is required for recruitment of the Vps26 subunit of retromer (32, 36). Since we obtained similar results by depleting cells of CLN5, we investigated whether CLN5 is implicated or not in Rab5 and Rab7 localization. We depleted cells of CLN5 and looked at the localization of RFP-Rab7 and RFP-Rab5. Our results showed that, in CLN5-depleted HeLa cells (Fig. 2.8D, E, and F), the intensity of RFP-Rab7 is lower than that seen in mock-depleted cells (Fig. 2.8B and H) or in CLN1-depleted cells (Fig. 2.8K). Quantification using our ad hoc algorithm showed a 40% decrease in the intensity of RFP-Rab7 at endosomes in CLN5-depleted cells (Fig. 2.8M, black bar) compared to mock-depleted cells (Fig. 2.8M, white bar) or CLN1-depleted cells (Fig. 2.8M, gray bar). Western blotting on whole-cell lysate determined that the absolute amounts of RFP-Rab7 in mock-, CLN1-, and CLN5-depleted cells were similar (Fig. 2.8N), suggesting that the decrease in endosomal intensity was due to lack of recruitment and not to degradation. We then compared the fluorescence intensities of RFP-Rab5 in mock- and CLN5-depleted cells and found a slight (18%) decrease in the intensity of RFP-Rab5 in CLN5-depleted cells (Fig. 2.8O, black bar) compared to mock-depleted cells (Fig. 2.8O, white bar). Consistent with our Rab7 data, we found no significant differences in the absolute amounts of RFP-Rab5 in either mock- or CLN5-depleted cells (Fig. 2.8P) as shown by Western blotting. We next tested if CLN5 was in a protein complex with Rab5 and/or Rab7 by cotransfecting HeLa cells with HA-CLN5 and myc-Rab1a, RFP-Rab5, or RFP-Rab7. Following an immunoprecipitation with anti-HA or anti-RFP antibodies, we found an interaction between HA-CLN5 and RFP-Rab5 and between HA-CLN5 and RFP-

Rab7 (Fig. 2.9A) but not between HA-CLN5 and myc-Rab1a (Fig. 2.9A). This suggested that CLN5 may act as a scaffold for the site of recruitment of Rab7 and subsequently retromer onto endosomal membranes.

CLN5 is required to activate Rab7.

We next tried to determine whether CLN5 was an effector of activated Rab7 or if CLN5 was required to activate Rab7. We tested whether dominant-active Rab7 (RFP-Rab7Q67L) could interact more strongly with CLN5 than wild-type Rab7, which would suggest that it would be an effector like Rab-interacting lysosomal protein (RILP) (8), rubicon (37), or retromer (32). Following an immunoprecipitation with anti-HA antibody, we found that both wild-type Rab7 and dominant-active Rab7 (Rab7Q67L) interacted with CLN5 (Fig. 2.9B). Moreover, we also found an interaction between dominant-negative Rab7 (RFP-Rab7T22N) and CLN5 (Fig. 2.9B), suggesting that CLN5 may be part of the Rab7 activation machinery and not an effector. Next, we compared the abilities of cells to load Rab5 and Rab7 with GTP in the presence or absence of CLN5 by measuring the amount of a cross-linkable GTP analogue incorporated into these Rab proteins. We found that, compared to mock-depleted cells, CLN5-depleted cells had much less GTP-loaded Rab7 (Fig. 2.9C) whereas the amount of GTP-loaded Rab5 was not significantly different (Fig. 2.9C). Quantification of the GTP-loading experiments showed that Rab7 loading was reduced by 76% in CLN5-depleted cells (Fig. 2.9D, black bar) compared to mock-depleted cells (Fig. 2.9D, white bar), while the amount of GTP-loaded Rab5 was not changed in mock-depleted cells (Fig. 2.9E, white bar) compared to CLN5-depleted cells (Fig. 2.9E, black bar). In support of this data, Rab7 binding to Rab-

interacting lysosomal protein (RILP), a known Rab7 effector (8), in a GST pulldown assay was less efficient in cells depleted of CLN5 compared to mock- or CLN1-depleted cells (Fig. 2.9F). Taken together, these results show that CLN5 is required to recruit and activate Rab7 to subsequently recruit retromer to endosomal membranes.

2.5 Discussion

Several conclusions can be drawn from the data presented in this work. First, CLN5 interacts with sortilin. However, this interaction is not required to traffic CLN5 to the lysosomal compartment; rather, it enables the lysosomal sorting receptors (CI-MPR and sortilin) to recycle to the Golgi compartment from endosomes, preventing their degradation. Second, CLN5 is implicated in the recruitment of retromer to endosomes by regulating the localization and activation of Rab7, which has previously been shown to be implicated in retromer recruitment (32, 36), to enable retrograde trafficking of the lysosomal sorting receptors. While it has been known that CLN5 is localized to the endosomal-lysosomal compartment, its function and mechanism of trafficking have not been elucidated. Since a previous report found that CI-MPR was not implicated in the trafficking of CLN5 (34), we tested if sortilin was a trafficking receptor for CLN5. We found that CLN5 binds sortilin; however, CLN5 can interact with sortilin at a more acidic pH, a condition that usually inhibits cargo-receptor interactions such as prosaposin binding to sortilin. This suggested that the CLN5-sortilin interaction may not be required for the trafficking of CLN5 to the lysosomal

compartment; in support of this idea, depletion of sortilin by shRNA had no effect on the cellular localization of CLN5, although it did prevent the proper localization of a known cargo, prosaposin, as was previously shown (20). Since neither CI-MPR nor sortilin seems to be implicated in the trafficking of CLN5, it is possible that LIMP-II is required, as it was recently shown that this protein can act as the sorting receptor for β -glucocerebrosidase (30). Moreover, since CLN5 is a potential transmembrane protein, it is therefore possible that CLN5, like other lysosome integral membrane proteins such as CD63 and Lamp2, can interact directly with cytosolic trafficking components to form its own trafficking vesicles. More work is required to elucidate this sorting and trafficking mechanism.

To elucidate the biological significance of the CLN5 interaction with lysosomal sorting receptors, we used siRNA to deplete CLN5 in HeLa cells. In CLN5-depleted cells, we found that the retrograde trafficking of both sortilin and CI-MPR to the Golgi compartment was impeded, which led to their degradation. Interestingly, CI-MPR and sortilin are degraded with similar kinetics in both CLN5- and retromer-depleted cells. On the basis of that finding, we tested the effect of CLN5 depletion on the recruitment of retromer to endosomes. Compared to mock- and CLN1-depleted cells, the recruitment of the Vps portion of retromer to endosomes is greatly reduced in CLN5-depleted cells, as shown by results revealing a decrease in Vps26 localization to endosomal membranes by immunofluorescence and Vps26 and Vps35 by membrane isolation.

The recruitment of retromer to endosomal membranes is a tightly regulated process that requires the small G proteins Rab5 and Rab7 (32, 36). Our results show a great reduction in the amount of Rab7 and a slight reduction in the amount of Rab5 found on endosomal membranes in CLN5-depleted cells. Interestingly, we also found that the activation of Rab7 was greatly impaired but found no changes in the activation of Rab5. A recent paper demonstrated that the Mon1-Ccz1 complex is a Rab guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the yeast homologue of Rab7 (26). It is possible that CLN5 could recruit this GEF to localize and/or activate Rab7. The molecular details of this event need to be further elucidated. If CLN5 is a transmembrane domain protein, it is possible that CLN5 could interact directly with Mon1 and/or Rab7. Alternatively, the interaction could be indirect and mediated via CLN3, a known interactive partner of CLN5. Further work is required to determine this.

Taken together, our results support a role for CLN5 in the retrograde trafficking of the lysosomal sorting receptors in mammalian cells. We propose that, upon arrival in the more acidic environment of the endosome (Fig. 2.10, step 1), cargo dissociates from the lysosomal sorting receptors and is replaced by CLN5 (Fig. 2.10, step 2). This provides a signal and/or scaffold to recruit and activate Rab7 (Fig. 2.10, step 2) followed by the recruitment of retromer (Fig. 2.8, step 3). This then enables the receptor to traffic to the Golgi compartment for another round of sorting and trafficking. In conclusion, results presented in this study are consistent with a new model suggesting that CLN5 acts as an endosomal switch, allowing lysosomal sorting receptors to recycle to the Golgi compartment for another round of vesicular trafficking and cargo sorting.

2.6 Acknowledgements

We thank Peter J. McCormick (University of Barcelona) and Christine L. Lavoie (University of Sherbrooke) for critical reading of the manuscript and for helpful discussions.

This work was funded by grants from the SickKids Foundation (XG08-027) and CIHR (operating grant MOP-102754) to S.L. and NSERC and FQRNT to S.C. S.L. and S.C. are recipients of a salary award from Fonds de la recherche en santé du Quebec. A.M. is a recipient of a Nephrology research fellowship from the Fondation de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

2.7 References

1. Arighi CN, Hartnell LM, Aguilar RC, Haft CR, Bonifacino JS. 2004. Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* 165:123–133.
2. Attar N, Cullen PJ. 2010. The retromer complex. *Adv. Enzyme Regul.* 50:216–236.
3. Bellizzi JJ, III, et al. 2000. The crystal structure of palmitoyl protein thioesterase 1 and the molecular basis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:4573–4578.
4. Bessa C, et al. 2006. Two novel CLN5 mutations in a Portuguese patient with vLINCL: insights into molecular mechanisms of CLN5 deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 89:245–253.
5. Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J. 2003. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:409–414.
6. Bonifacino JS, Rojas R. 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:568–579.
7. Bonifacino JS, Traub LM. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:395–447.
8. Cantalupo G, Alifano P, Roberti V, Bruni CB, Bucci C. 2001. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *EMBO J.* 20:683–693.

9. Codlin S, Mole SE. 2009. *S. pombe* btn1, the orthologue of the Batten disease gene CLN3, is required for vacuole protein sorting of Cpy1p and Golgi exit of Vps10p. *J. Cell Sci.* 122:1163–1173.
10. Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S. 1989. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* 264:12115–12118.
11. Dumaresq-Doiron K, Savard MF, Akam S, Costantino S, Lefrancois S. 2010. The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIIIalpha is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes. *J. Cell Sci.* 123:2273–2280.
12. Goebel HH, Wisniewski KE. 2004. Current state of clinical and morphological features in human NCL. *Brain Pathol.* 14:61–69.
13. Gonzalez RC, Woods RE, Eddins SL. 2004. Digital image processing using MATLAB. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
14. Harbour ME, et al. 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J. Cell Sci.* 123:3703–3717.
15. Harterink M, et al. 2011. ASNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion. *Nat. Cell Biol.* 13:914–923.
16. Holmberg V, et al. 2004. The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glycoprotein expressed in the developing brain. *Neurobiol. Dis.* 16:29–40.

17. Isosomppi J, Vesa J, Jalanko A, Peltonen L. 2002. Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein. *Hum. Mol. Genet.* 11:885– 891.
18. Jalanko A, Braulke T. 2009. Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim. Biophys. Acta* 1793:697–709.
19. Lefrançois S, Janvier K, Boehm M, Ooi CE, Bonifacino JS. 2004. An ear-core interaction regulates the recruitment of the AP-3 complex to membranes. *Dev. Cell* 7:619 – 625.
20. Lefrancois S, Zeng J, Hassan AJ, Canuel M, Morales CR. 2003. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *EMBO J.* 22:6430–6437.
21. McCormick PJ, et al. 2008. Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic* 9:1984–1997.
22. McGough IJ, Cullen PJ. 2011. Recent advances in retromer biology. *Traffic* 12:963–971.
23. Metcalf DJ, Calvi AA, Seaman M, Mitchison HM, Cutler DF. 2008. Loss of the Batten disease gene CLN3 prevents exit from the TGN of the man- nose 6-phosphate receptor. *Traffic* 9:1905–1914.
24. Mole SE, Williams RE, Goebel HH. 2005. Correlations between geno- type, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics* 6:107–126.
25. Narayan SB, Rakheja D, Tan L, Pastor JV, Bennett MJ. 2006. CLN3P, the Batten’s disease protein, is a novel palmitoyl-protein Delta-9 desaturase. *Ann. Neurol.* 60:570–577.
26. Nordmann M, et al. 2010. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr. Biol.* 20:1654–1659.

27. Otsu N. 1979. Threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.* 9:62–66.
28. Phillips SN, Benedict JW, Weimer JM, Pearce DA. 2005. CLN3, the protein associated with batten disease: structure, function and localization. *J. Neurosci. Res.* 79:573–583.
29. Ramirez-Montealegre D, Pearce DA. 2005. Defective lysosomal arginine transport in juvenile Batten disease. *Hum. Mol. Genet.* 14:3759–3773.
30. Reczek D, et al. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 131: 770–783.
31. Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS. 2007. Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol. Cell. Biol.* 27:1112–1124.
32. Rojas R, et al. 2008. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.* 183:513–526.
33. Savukoski M, et al. 1998. CLN5, a novel gene encoding a putative trans-membrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nat. Genet.* 19:286–288.
34. Schmiedt ML, et al. 2010. The neuronal ceroid lipofuscinosis protein CLN5: new insights into cellular maturation, transport, and consequences of mutations. *Hum. Mutat.* 31:356–365.
35. Seaman MN. 2004. Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J. Cell Biol.* 165:111–122.

36. Seaman MN, Harbour ME, Tattersall D, Read E, Bright N. 2009. Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J. Cell Sci.* 122:2371–2382.
37. Sun Q, Westphal W, Wong KN, Tan I, Zhong Q. 2010. Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:19338–19343.
38. Vesa J, et al. 2002. Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Mol. Biol. Cell* 13:2410–2420.
39. Yuan L, Morales CR. 2010. A stretch of 17 amino acids in the prosaposin C terminus is critical for its binding to sortilin and targeting to lysosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 58:287–300.

2.8 Figures

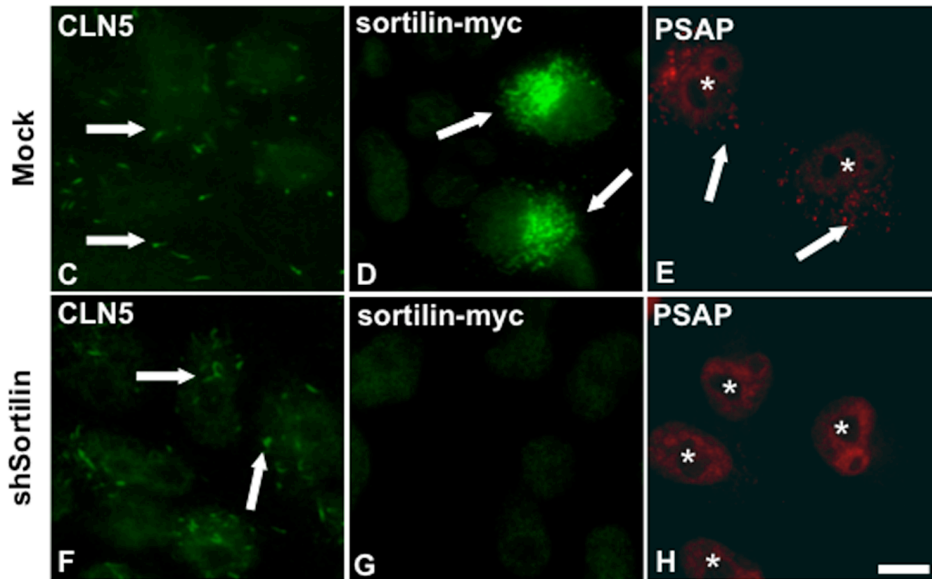
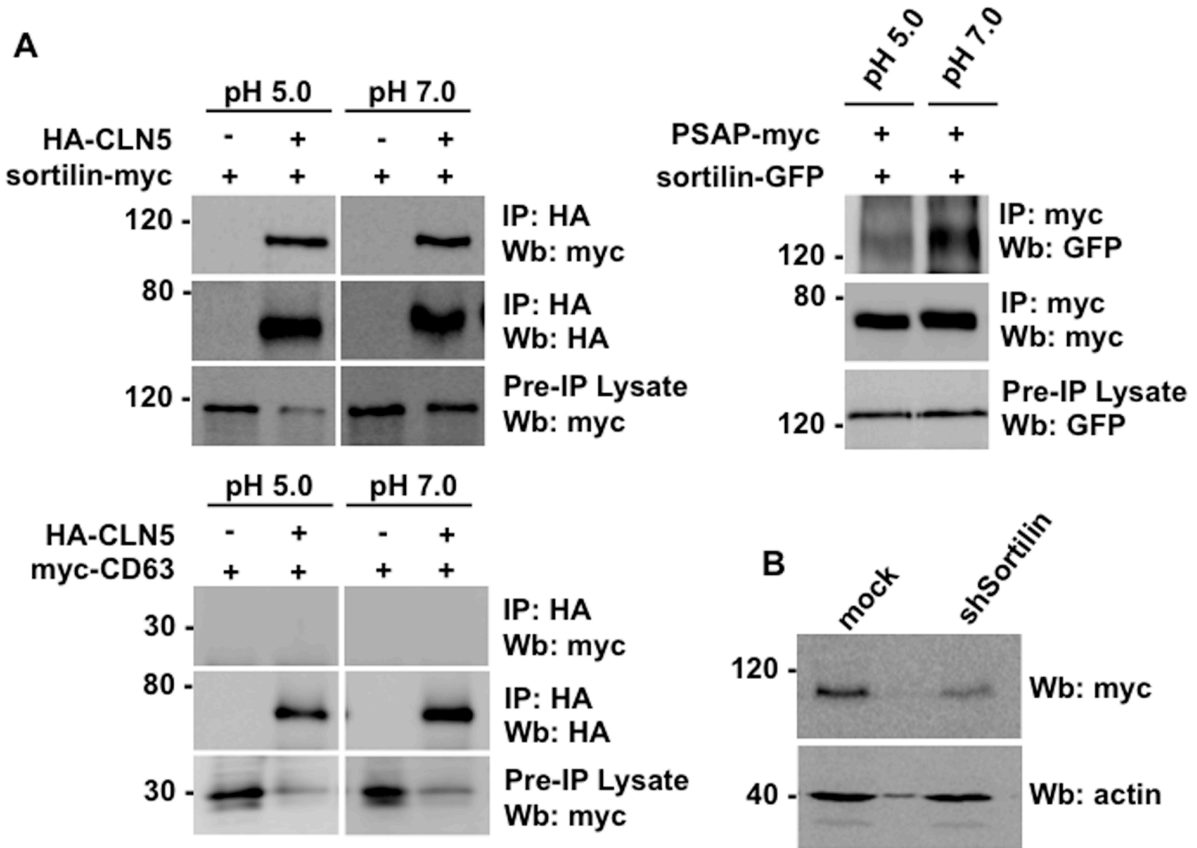
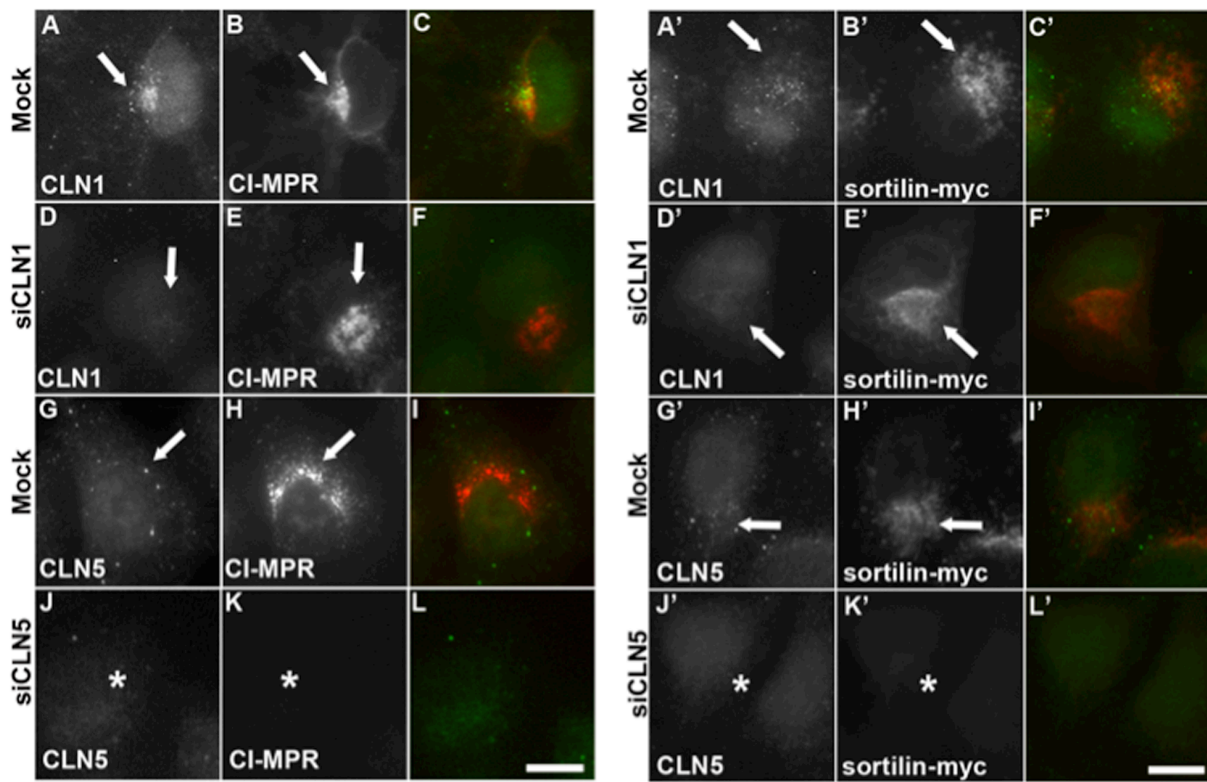


Figure 2.1 CLN5 interacts with the lysosomal sorting receptors.

(A) HeLa cells were transfected with sortilin-myc, myc-CD63, prosaposin-myc (PSAP-myc), sortilin-GFP, and HA-CLN5 as indicated. Whole-cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-HA or anti-myc antibodies at the pH shown and subjected to Western blotting (Wb) with anti-myc, anti-HA, or anti-GFP antibody. The amount of sortilin-myc, myc-CD63, or sortilin-GFP pre-immunoprecipitation (Pre-IP) is shown and represents 10% of the input. (B) HeLa cells transfected with sortilin-myc were either mock or sortilin depleted with a short-hairpin construct (shSortilin). Whole-cell lysates were run on 12% acrylamide gels and subjected to Western blotting (Wb) with anti-myc and anti-actin antibodies. HeLa cells expressing sortilin-myc were mock transfected (C, D, and E) or transfected with shSortilin (F, G, and H) to deplete sortilin. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and immunostained with anti-CLN5 antibody (C and F, green), anti-myc antibody (D and G, green), or antiprosaposin (PSAP) antibody (E and H, red). Arrows indicate the normal localization of CLN5 (C and F), sortilin-myc (D), or PSAP (E). Stars indicate nuclear background staining for antiprosaposin antibody (E and H). Bar, 10 μ m.



M

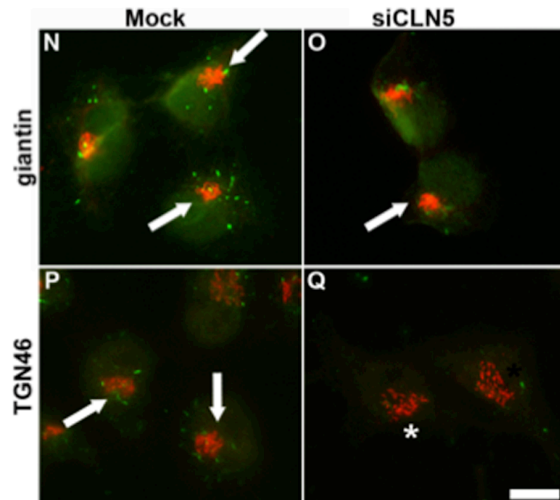
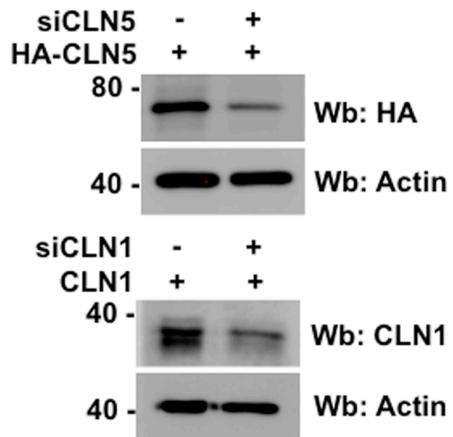


Figure 2.2 CLN5 is required for the localization of CI-MPR and sortilin.

HeLa cells were mock depleted (A to C, A' to C', G to I, and G' to I'), CLN1 depleted (D to F and D' to F'), or CLN5 depleted (J to L and J' to L') and immunostained with anti-CLN1 (A, C, A', C', D, F, D', and F', green), anti-CLN5 (G, I, G', I', J, L, J', and L, green), anti-CI-MPR (B, E, H, and K, red), or anti-myc (B', E', H', and K', red) following sortilin-myc transfection. Arrows indicate the perinuclear staining of CI-MPR (B, E, and H) and sortilin (B', E', and H'), while stars indicate lack of perinuclear staining for CI-MPR (K) and sortilin-myc (K'). Bar, 10 μ m. (M) HeLa cells were transfected with HA-CLN5 following siRNA treatment (siCLN5 or siCLN1) as indicated. Whole-cell lysates were subjected to Western blotting (Wb) with anti-HA, anti-CLN1, or antiactin antibodies. HeLa cells were either mock depleted (N and O) or CLN5 depleted (P and Q) and immunostained with anti-CLN5 antibody (N to Q, green) and giantin (N and O, red) or TGN46 (P and Q, red). Arrows indicate the normal staining pattern of giantin and TGN46, while stars represent dispersed staining. Bar, 10 μ m.

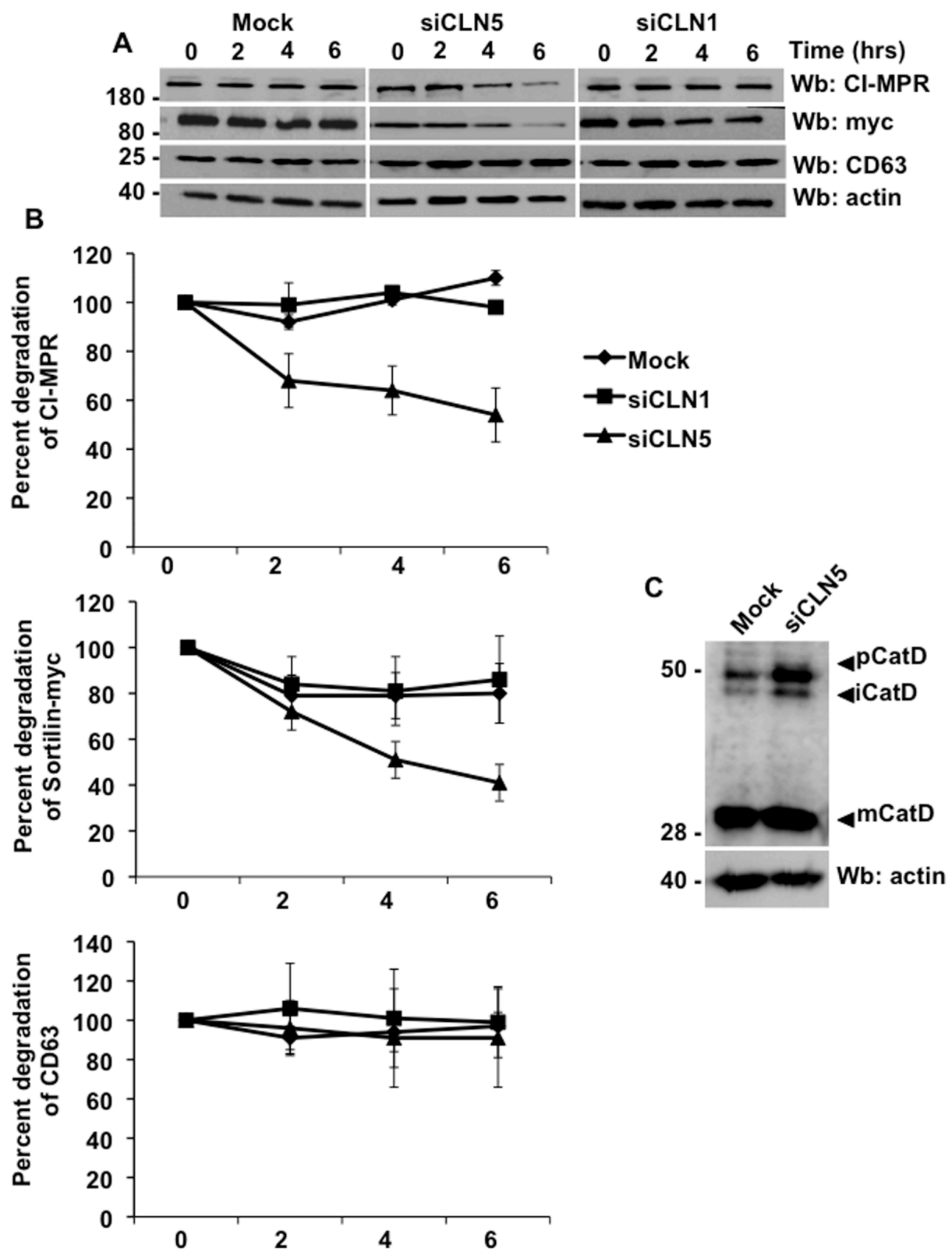


Figure 2.3 CI-MPR and sortilin are degraded in CLN5-depleted cells.

(A) HeLa cells transfected with sortilin-myc were mock, CLN5, or CLN1 depleted and incubated with cycloheximide (50 $\mu\text{g/ml}$) for the times indicated. Total cell lysates were subjected to Western blotting (Wb) with anti-CI-MPR, anti-myc, anti-CD63, or antiactin antibodies. (B) Quantification of 3 separate cycloheximide chase experiments performed with cells that were mock, CLN1, or CLN5 depleted and subjected to Western blotting for endogenous anti-CI-MPR, anti-myc, or anti-CD63 antibodies. (C) Total cell lysates from HeLa cells that were mock or CLN5 depleted were subjected to Western blotting with anti-cathepsin D or anti-actin antibodies.

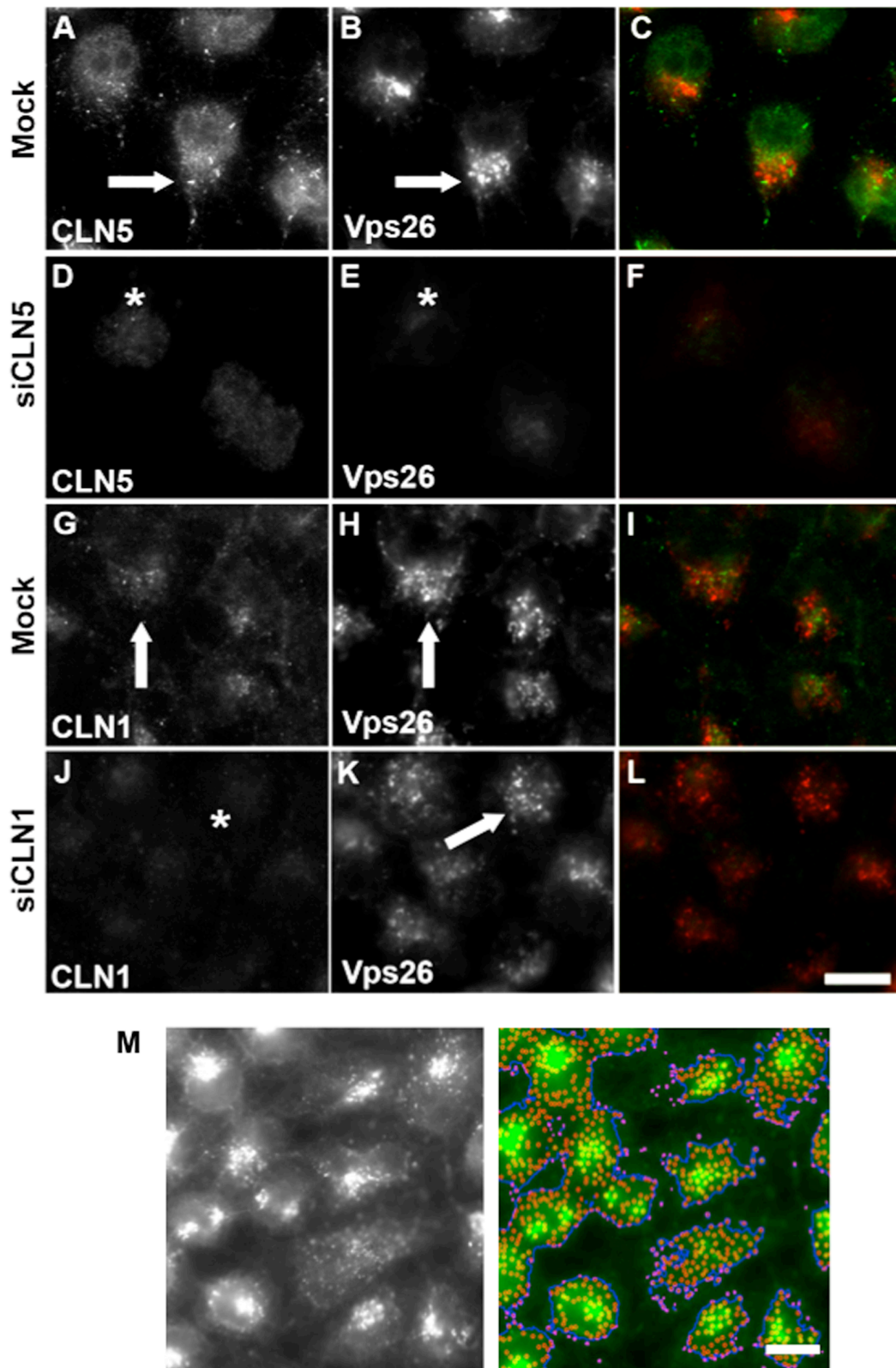


Figure 2.4 Recruitment of the Vps26 subunit of retromer to endosomes requires CLN5.

HeLa cells were mock depleted (A to C and G to I), CLN5 depleted (D to F), or CLN1 depleted (J to L) and immunostained with anti-CLN5 (A, C, D, and F, green), anti-CLN1 (G, I, J, and L, green), and anti-Vps26 (B, C, E, F, H, I, K, and L, red) antibodies. Arrows represent normal staining for CLN5, CLN1, and Vps26, while stars highlight lack of CLN5 (D), CLN1 (J), and Vps26 (E) staining. Bar, 10 μm . (M) Representative image of Vps26-positive structures identified (red circles) by our ad hoc algorithm to determine the intensity of Vps26 staining in HeLa cells.

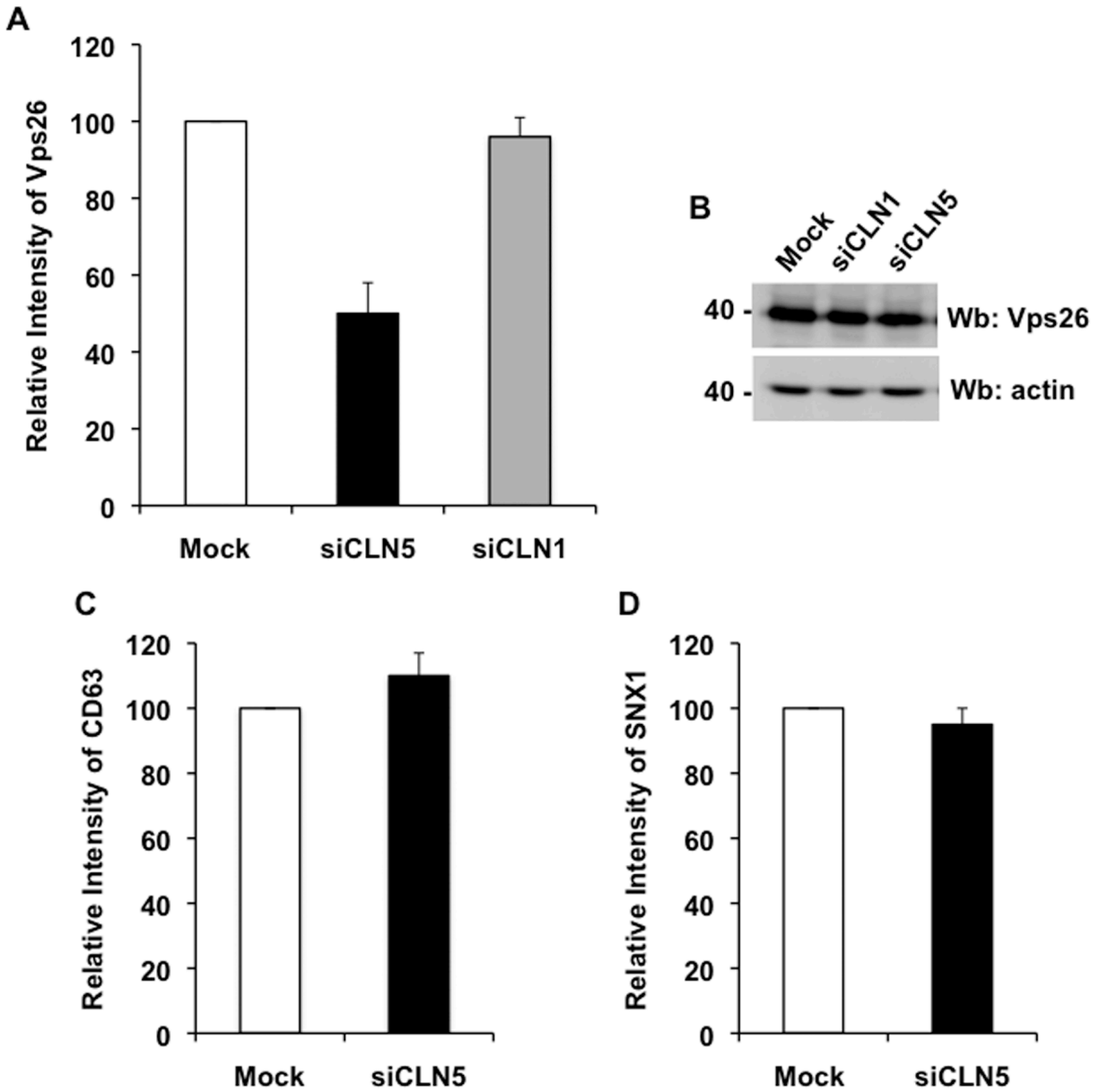
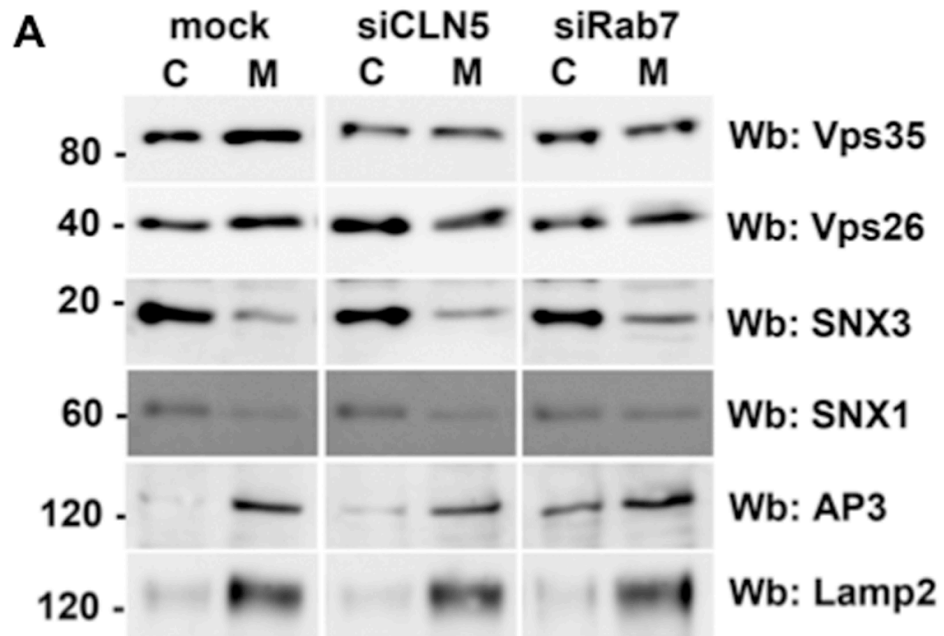


Figure 2.5 CLN5 is required to recruit retromer to endosomal membranes.

(A) Quantification of the relative fluorescence intensities of Vps26 staining in mock-depleted cells, CLN5-depleted cells, and CLN1-depleted cells. Data represent the relative fluorescence intensities of Vps26 staining for 1,400, 1,300, and 3,000 endosomes per condition, respectively, with error bars representing \pm standard errors of the means (SEM). (B) HeLa

lysates from mock-, CLN-, and CLN5-depleted cells were run on a 12% polyacrylamide gel and subjected to Western blotting (Wb) with anti-Vps26 and antiactin antibodies. (C) Quantification of the relative fluorescence intensities of CD63 staining in mock-depleted (white bar) and CLN5-depleted (black bar) cells. Data represent quantification of the relative intensities of CD63 staining for 4,800 and 4,000 endosomes, respectively, with the error bars representing \pm SEM. (D) Quantification of the relative fluorescence intensities of SNX1 staining in mock-depleted and CLN5-depleted cells. Data represent quantification of the relative intensities of SNX1 staining for 4,000 and 2,500 endosomes, respectively, with the error bars representing \pm SEM.



B

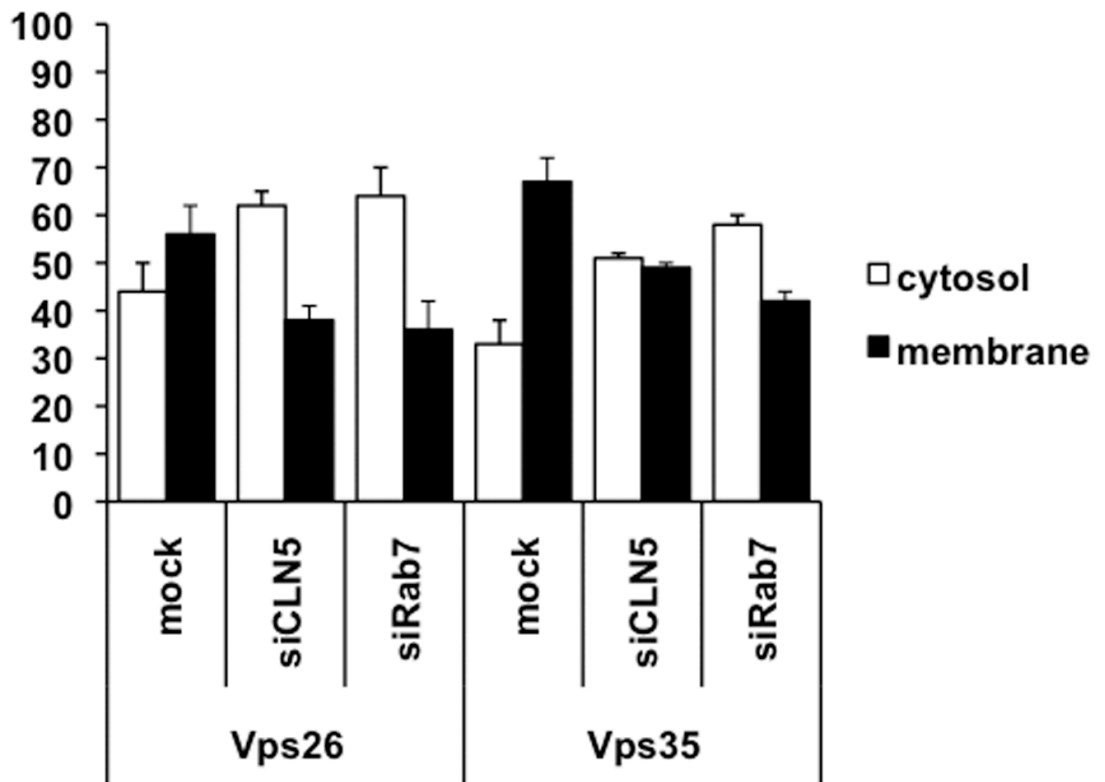


Figure 2.6 The cytosolic distribution and membrane distribution of Vps26 and Vps35 are altered in CLN5-depleted cells.

(A) Cytosolic (C) and membrane (M) fractions from mock-, CLN5-, or Rab7-depleted cells were stained with anti-Vps35, anti-Vps26, anti-SNX3, anti-SNX1, anti-AP3, and anti-Lamp2 antibodies. (B) Quantification of the cytosolic fraction and membrane fraction of Vps26 and Vps35 from 3 separate experiments.

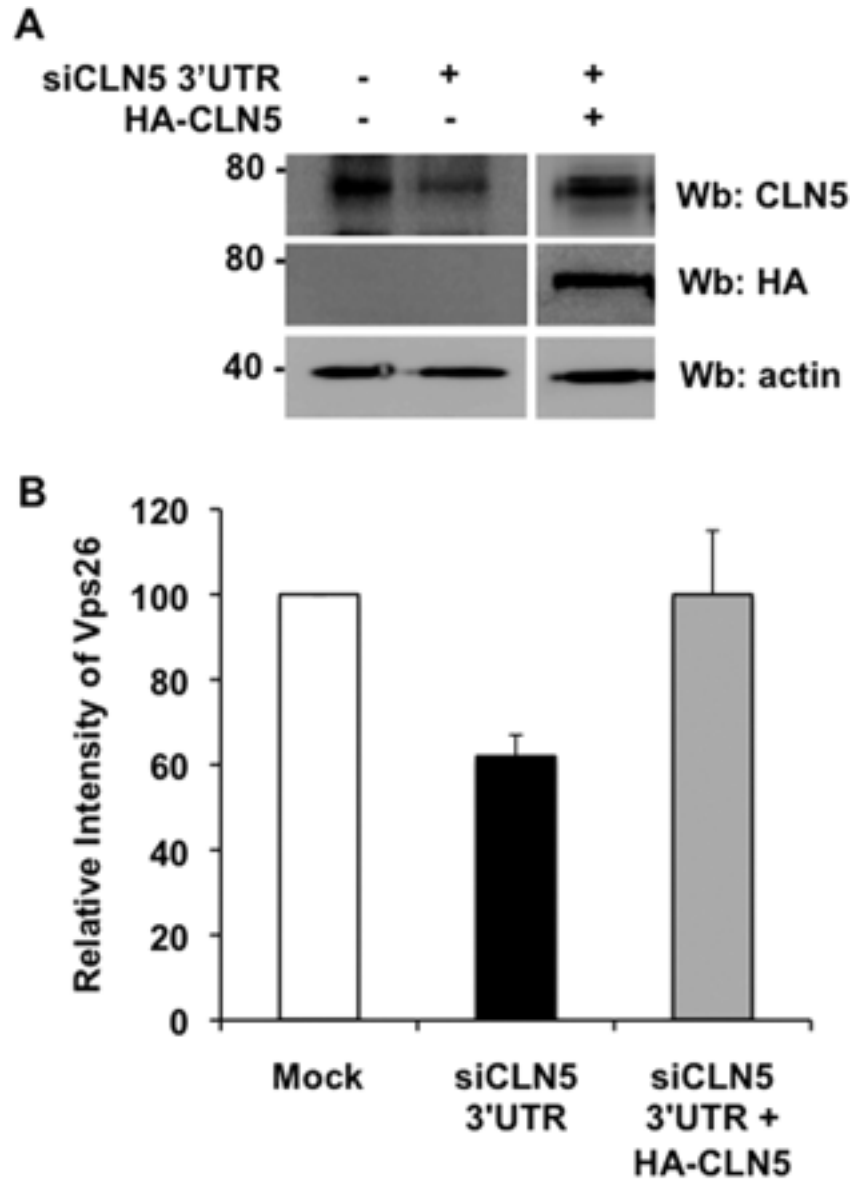


Figure 2.7 Transient expression of wild-type HA-CLN5 rescues the recruitment of Vps26 in CLN5-depleted cells.

(A) HeLa cells were either mock or CLN5 depleted with siRNA against the 3'UTR of CLN5. Cells were also transfected or not with HA-CLN5, and total cell lysates were subjected to Western blotting (Wb) for endogenous CLN5 by the use of anti-CLN5, transfected HA-CLN5 with anti-HA antibody, or antiactin. (B) Quantification of the relative fluorescence intensities

of Vps26 staining in mock-depleted cells, CLN5-depleted cells, and CLN5-depleted cells transfected with HA-CLN5. Data represent the relative intensities of Vps26 staining for 3,400, 2,200, and 4,700 endosomes per condition, respectively, with error bars representing \pm SEM.

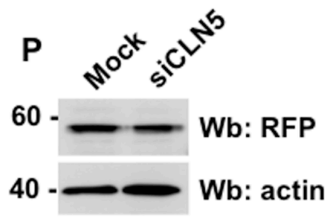
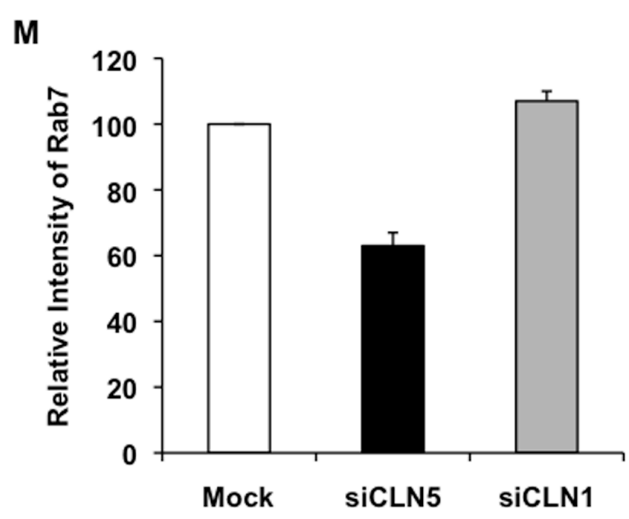
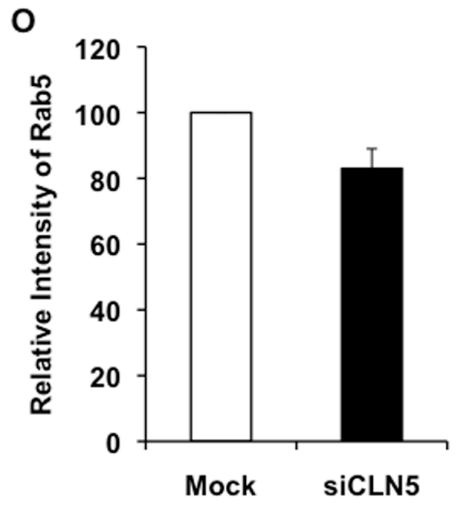
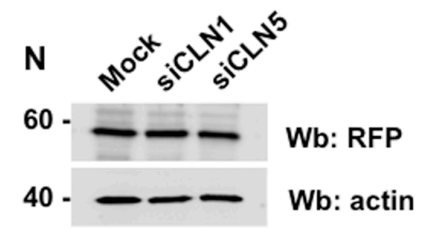
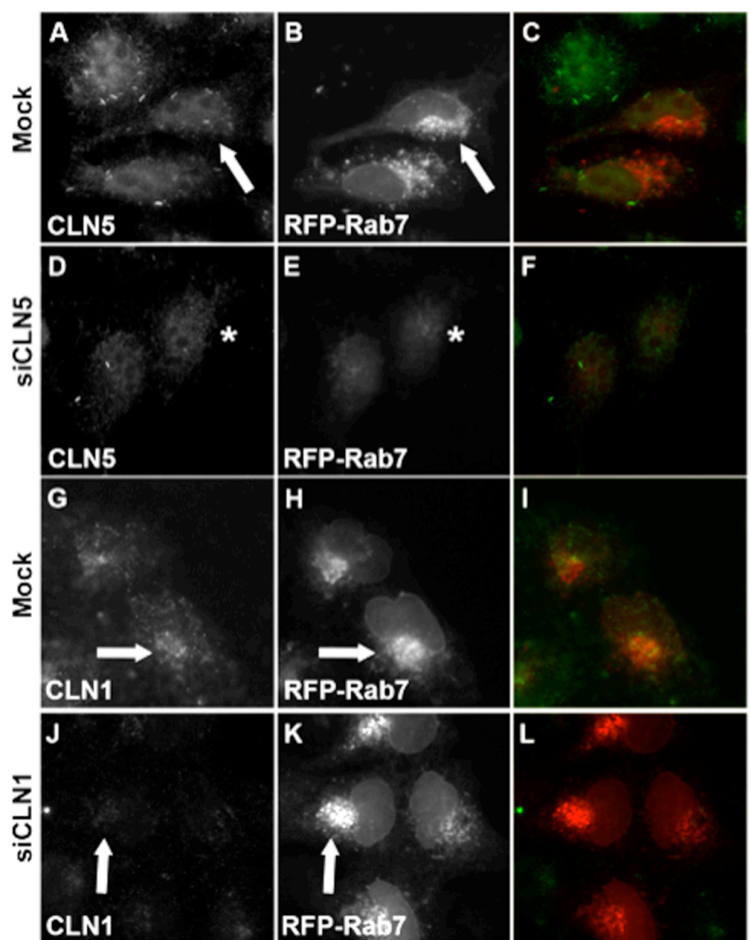


Figure 2.8 CLN5 is required for the localization of Rab7.

(A to L) HeLa cells were mock depleted (A to C and G to I), CLN5 depleted (D to F), or CLN1 depleted (J to L) and transfected with RFP-Rab7 (A to L). Following transfection, cells were fixed in 4% paraformaldehyde and then immunostained with anti-CLN5 (A, C, D, and F, green) or anti-CLN1 (G, I, J, and L, green) antibodies. Arrows indicate the normal distribution of CLN5 (A), CLN1 (G), and Rab7 (B, H, and K). Stars indicate the lack of CLN5 expression (D) and the lack of recruitment of RFP-Rab7 (E) in CLN5-depleted cells. (M) Quantification of the fluorescence intensity of RFP-Rab7 in mock-depleted, CLN5-depleted, and CLN1-depleted cells. Data represent 5,700, 9,300, and 1,600 endosomes per condition, respectively, with error bars representing \pm SEM. (N) Expression of RFP-Rab7 in mock-, CLN1-, or CLN5-depleted cells was examined by Western blotting (Wb) with anti-RFP antibody. Anti-actin staining served as a loading control. (O) Quantification of the fluorescence intensity of RFP-Rab5 in mock-depleted and CLN5-depleted cells. Data represent the quantification of 2,800 and 4,000 endosomes per condition, respectively. (P) Expression of RFP-Rab5 in mock- and CLN5-depleted cells was examined by Western blotting (Wb) with anti-RFP antibody. Antiactin staining served as a loading control.

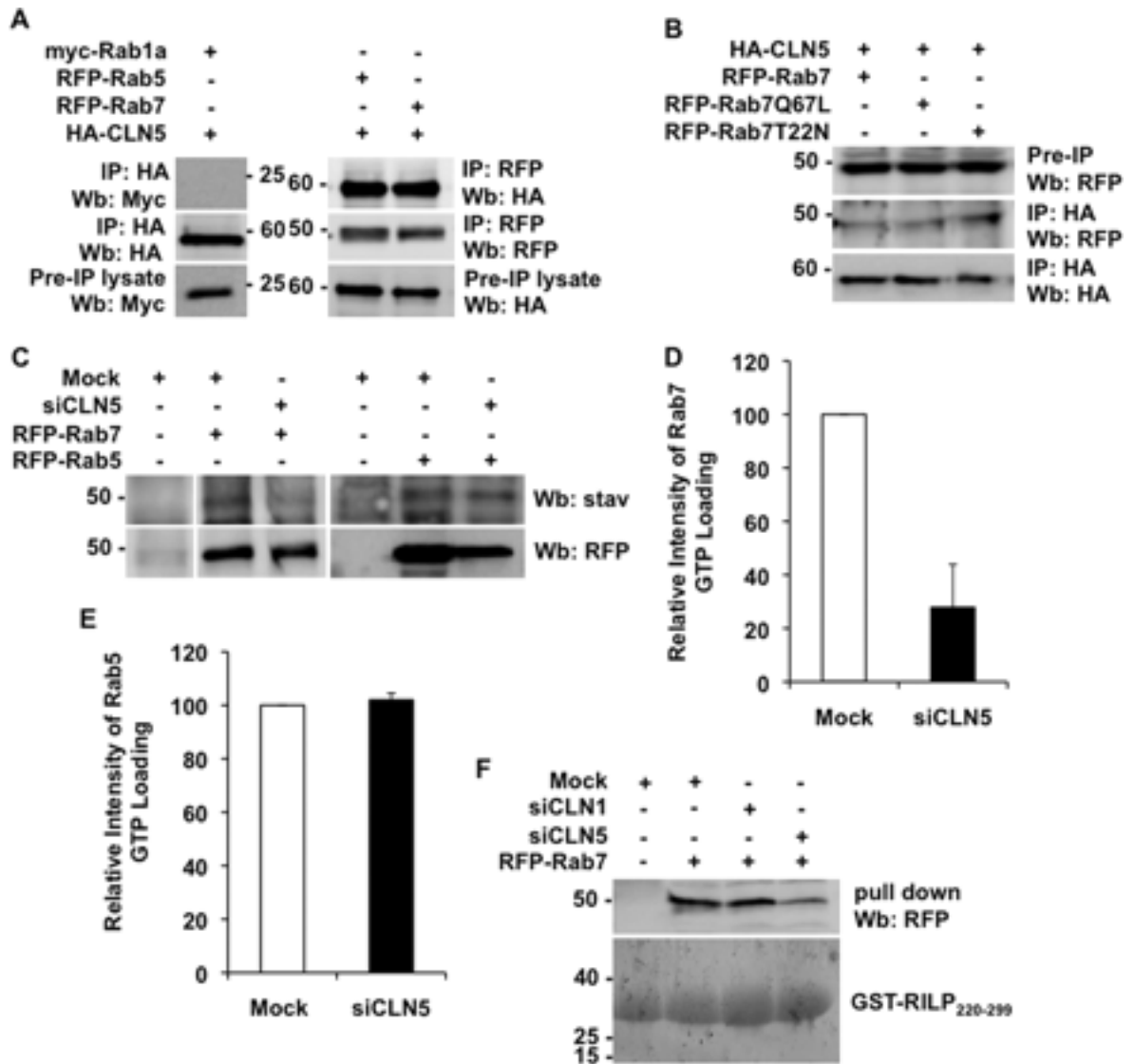


Figure 2.9 CLN5 is required for the activation of Rab7.

(A) HeLa cells were transfected with HA-CLN5 and myc-Rab1a, RFP-Rab5, or RFP-Rab7 as indicated. Total cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-RFP or anti-HA antibodies and subjected to Western blotting (Wb) with anti-HA, anti-myc, or anti-RFP antibodies. The preimmunoprecipitation (pre-IP) is shown and represents 10% of the input.

(B) HeLa cells were cotransfected with HA-CLN5 and wild-type RFP-Rab7, dominant-active

RFP-Rab7Q67L, or dominant-negative RFP-Rab7T22N. Total cell lysate was immunoprecipitated (IP) with anti-HA antibody and subjected to Western blotting (Wb) with either anti-RFP or anti-HA antibodies. The amount of RFP-Rab7, RFP-Rab7Q67L, or RFP-Rab7T22N preimmunoprecipitation (Pre-IP) is shown and represents 10% of the input. (C) The amounts of GTP-loaded Rab7 and Rab5 were determined using a nonhydrolysable biotin-conjugated probe (GTP; [γ] 4-azidoanilide 2',3'-biotin-long chain-hydrazone) in mock- or CLN5-depleted cells. The amount of loaded GTP probe was determined using streptavidin (stav), while the amounts of RFP-Rab7 or RFP-Rab5 were determined using anti-RFP antibody (Wb: RFP). (D) The relative intensities of GTP-loaded Rab7 in mock- and CLN5-depleted cells from 3 independent experiments, with the error bars representing \pm SEM. (E) The relative intensities of GTP-loaded Rab5 in mock- and CLN5-depleted cells from 3 independent experiments, with error bars representing \pm SEM. (F) GST-RILP₂₂₀₋₂₉₉ bound to glutathione-Sepharose beads was incubated with HeLa lysates expressing RFP-Rab7 that were mock, CLN1, or CLN5 depleted. The amount of bound RFP-Rab7 was detected by Western blotting (Wb) with anti-RFP antibody. The Coomassie-stained gel shows the amount of bound GST-RILP₂₂₀₋₂₉₉.

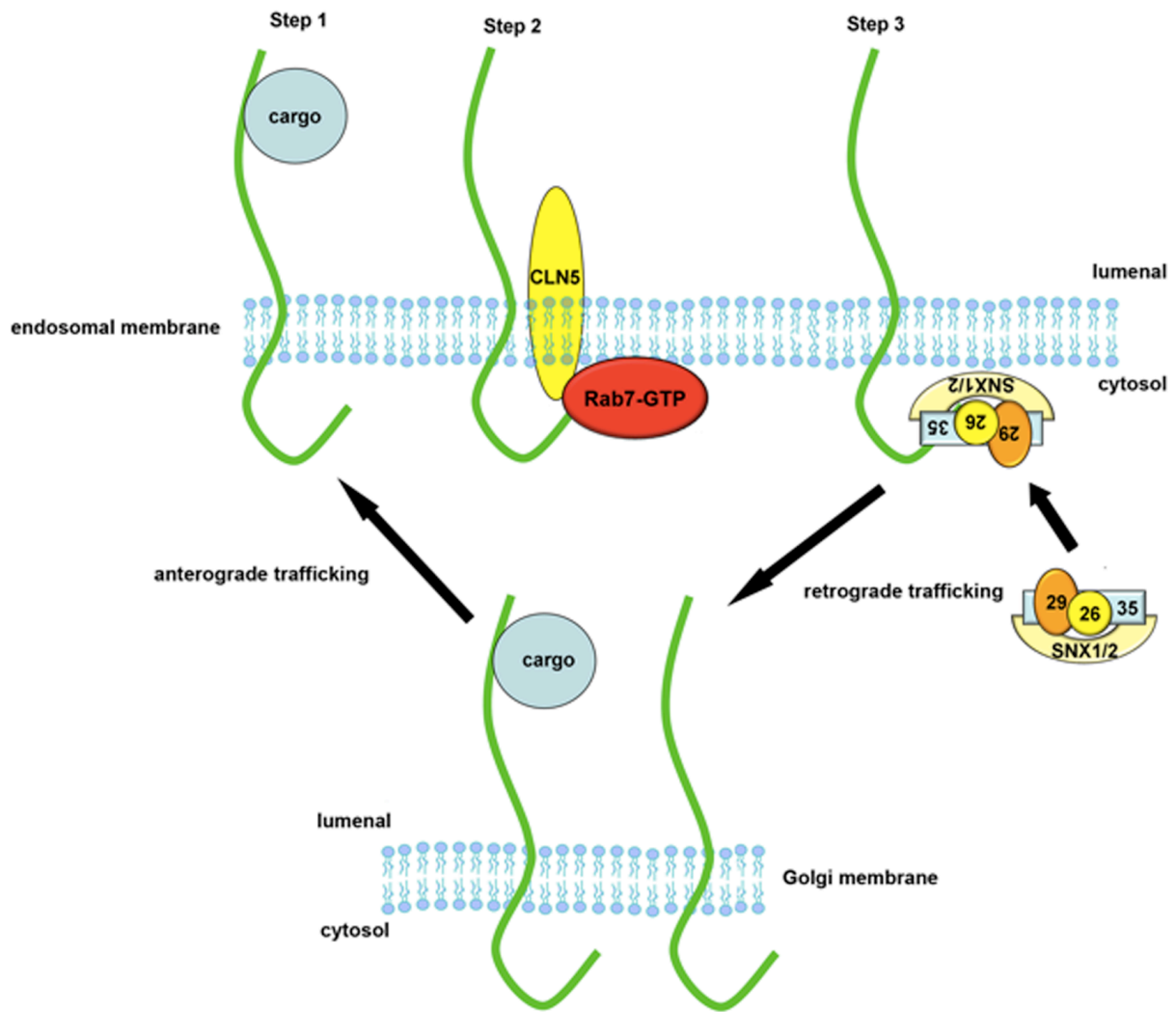


Figure 2.10 Model showing the role of CLN5 in sorting from the endosomes.

When the cargo-loaded lysosomal sorting receptor (green line) arrives at the endosome (Step 1), the change in pH causes a dissociation of the cargo from the receptor that subsequently leads to interaction with CLN5 (Step 2). This enables the recruitment and activation of Rab7 and the recruitment of retromer (Step 3) for recycling to the Golgi compartment, where it can interact with more cargo.

Chapitre 3

3. Article 2

Manuscrit prêt a publier.

“Ceroid-lipofuscinosis neuronal 5 (CLN5) is cleaved by members of the SPP family to produce a mature soluble protein”

Felix Jules^{1,2,*}, Etienne Sauvageau^{1,3,*}, Karine Dumaresq-Doiron¹, Javier Mazzaferri¹, Santiago Costantino^{1,4} and Stephane Lefrancois^{1,3,5}

* These authors contributed equally to this work

1 Centre de Recherche de l’Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Canada H1T 2M4

2 Département de biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada H3T 1J4

3 Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Canada H3A 2B2

4 Département d’Ophtalmologie et Institut de Génie Biomédical, Université de Montréal, Montréal, Canada H3T 1J4

5 Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada H3T 3J7

To whom correspondence should be addressed: Stephane Lefrancois, Departement de Medecine, Universite de Montreal et Centre de recherche de l'Hopital Maisonneuve-Rosemont. 5415 boul. de l'Assomption, Montreal, Quebec, Canada, H1T 2M4 phone Tel.: 514-252-3400 ext. 5896; Fax: 514-252-3430; E-mail: stephane.lefrancois at umontreal.ca

Key Words: cell biology, intracellular trafficking, intramembrane proteolysis, lysosomal storage disease, neurodegeneration, CLN5, Signal Peptide Peptidase, topology, neuronal ceroid lipofuscinosis

Background: CLN5 is translated as a type II membrane protein, but is soluble at the lysosome.

Results: CLN5 is cleaved by SPPL3 after residue 92 to produce a mature soluble protein.

Conclusion: SPPL3 is required to generate mature soluble CLN5.

Significance: Understanding the processing of CLN5 could lead to a therapeutic target.

3.1 Abstract

The Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are a group of recessive disorders of childhood with overlapping symptoms including vision loss, ataxia, cognitive regression and premature death. 14 different genes have been linked to NCLs (CLN1-CLN14), but the functions of the proteins encoded by the majority of these genes have not been fully elucidated. Mutations in the CLN5 gene are responsible for the Finnish variant late-infantile form of NCL (Finnish vLINCL). CLN5 is translated as a 407 amino acid transmembrane domain containing protein that is heavily glycosylated, and subsequently cleaved into a mature soluble protein. Functionally, CLN5 is implicated in the recruitment of the retromer complex to endosomes, which is required to sort the lysosomal sorting receptors from endosomes to the trans-Golgi network. The mechanism that processes CLN5 into a mature soluble protein is currently not known. Herein, we show that SPPL3, a member of the SPP intramembrane protease family, cleaves CLN5 into a mature soluble protein and a N-terminal fragment, which is subsequently cleaved by SPPL2b. This work further characterizes the biology of CLN5 in the hopes of identifying a novel therapeutic strategy for affected children.

3.2 Introduction

Neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs) are recessive disorders that are the most common neurodegenerative disorders of childhood (1). Common symptoms of NCLs include gradual dementia, progressive vision loss, ataxia and seizures and they almost always result in premature death (2). At the cellular level, NCL patients present an accumulation of autofluorescent lipopigments in cellular subcompartments (3). Germline mutations in 14 different genes (CLN1-CLN14) have been shown to lead to human disease (4), but the exact function of many of the proteins encoded by these genes remains unknown or poorly understood hampering the development of therapies.

CLN5 is encoded on chromosome 13q21–q32 (5,6) and produces a 407 amino acid protein of a predicted molecular mass of 46 kDa that is heavily glycosylated (7-9). Mutations in the CLN5 gene were first identified in 18 families in Finland thus naming this variant of NCL: late-infantile Finnish variant (Finnish vLINCL) (10,11). Since the initial identification of the disease and mapping of the gene responsible, patients with NCL derived from a mutation in the CLN5 gene have been found in various regions around the globe (9,12).

Several studies have shown that CLN5 localizes to the lysosomal compartment (8,13) but little data is available as to the function of CLN5. We have recently shown a role for CLN5 in controlling the itinerary of the lysosomal sorting receptors by regulating retromer

recruitment at late endosomes (14). Indeed, we found that CLN5 was required for the activation and localization of Rab7 and subsequently, the recruitment of retromer to endosomal membranes. Furthermore, we found that in CLN5-depleted cells, both sortilin and the cationic independent mannose-6-phosphate receptor (CIMPR) were degraded in lysosomes, a similar phenotype as observed in retromer-depleted cells (15,16) or when palmitoylation is absent from these receptors (17). Our data strongly suggests that CLN5 is a key regulator in the efficient endosome-to-Golgi trafficking of these receptors. Although this shed some light as to the function of CLN5, there is still uncertainty regarding the characterization of the protein.

Although most prediction tools suggest that CLN5 could have at least one transmembrane domain and some experimental evidence supports this (18-20), other studies have shown that it is a soluble protein (20,21). A more recent study showed that CLN5 had one transmembrane domain and that the soluble form of the protein was potentially membrane anchored (22). It is clear that in lysosomes, CLN5 is a soluble protein and it was predicted that the signal peptide cleavage site was at residue 96 (8). However, this site was never experimentally tested nor the mechanism that cleaved CLN5 into a soluble protein identified. In this work, we found that CLN5 is produced as a type II transmembrane domain protein and cleaved by a member of the Signal Peptide Peptidase (SPP) family after residue 92 to produce a soluble lysosomal protein (residues 93 - 407).

3.3 Materials and methods

Antibodies, cDNA constructs and other reagents

All reagents, unless specified, were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON). The HA-CLN5 and CLN5-HA constructs were purchased from Genecopoeia (Germantown, MD) and sequenced to ensure accuracy. The CLN5Y392* and CLN5W75* mutants were generated using the QuikChange II XL Mutagenesis kit (Stratagene, Mississauga, ON) to introduce a stop codon (*). The prosaposin-CLN5 chimera was engineered by cutting PSAP-myc (23) with NheI and inserting residues 94-407 of CLN5. The mouse monoclonal anti-hemagglutinin (anti-HA) antibody (MMS-101P) was purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON); polyclonal anti-Lamp2 antibody (L0668) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON); goat polyclonal anti-CLN5 antibody (sc-49928) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); polyclonal anti-HA antibody (ab20084), polyclonal anti-Vps26 antibody (ab23892) and monoclonal anti-Lamp2 antibody (ab25631) were purchased from Abcam (Cambridge, MA); monoclonal anti-EEA1 antibody (610417) was purchased from BD Bioscience (Mississauga, ON). Anti-mouse monoclonal and anti-goat polyclonal antibodies conjugated to AlexaFluor 488 and AlexaFluor 594 used for immunofluorescence were obtained from Life Technologies (Burlington, ON). The protease inhibitor cocktail was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). ENDO H and PNGase F were obtained from New England Biolabs (Whitby, ON). Leupeptin, pepstatin, E64 were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON) and (Z-LL)₂-ketone from EMD Millipore (Etobicoke, ON).

Cell culture

HeLa, HEK 293T and COS-7 cells were cultured in DMEM containing L-glutamine (Life Technologies, Burlington ON) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 5% penicillin/streptomycin and maintained in 5% CO₂ at 37 °C. Cells were transfected using 1 µg of DNA per 10-cm² plate with Lipofectamine LTX Transfection Reagent (Life Technologies, Burlington ON) following the manufacturer's protocol or using linear 25 kDa polyethylenimine (Polysciences, Inc., Warrington, PA) as previously described (24).

Membrane isolation Assay

24 hours post-transfection, cells were collected, snap frozen with liquid nitrogen and allowed to thaw at room temperature. Samples were resuspended in buffer 1 (0.1 M Mes-NaOH pH 6.5, 1 mM MgAc, 0.5 mM EGTA, 200 µM sodium orthovanadate, 0.2 M sucrose) and centrifuged at 10 000 g for 5 min at 4°C. The supernatant containing cytosolic proteins was collected (C, cytosolic fraction) and the pellet was resuspended in buffer 2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100) and spun at 10 000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant containing membrane proteins was collected (M, membrane fraction) for further analysis (25).

Sodium carbonate extraction

24 hours post-transfection, cells were collected and resuspended in ice-cold 0.1 M sodium carbonate at pH 11.5. Cells were passed 10 times through a 23G syringe and the samples incubated on ice for 30 min. Samples were then centrifuged at 100 000 g for 1 hr at 4 °C. The

supernatant containing soluble proteins was collected and the pellet containing transmembrane proteins was resuspended in ice-cold 0.1 M sodium carbonate at pH 11.5. Samples were then analyzed by Western blot.

Membrane protein topology

24 hours post-transfection, cells were split into 3 groups. In group 1, the cells were lysed in ice-cold TNE (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100) containing protease inhibitors. In group 2, cells were treated with 20 mM digitonin in KHM buffer (110 mM potassium acetate, 20 mM HEPES and 2mM MgCl₂) on ice for 10 min prior to lysis in TNE. In group 3, cells were treated with digitonin followed by a 30 min treatment with trypsin (1/30 dilution of 0.25% Trypsin-EDTA; Life Technologies, Oakville ON) solution diluted in KHM on ice prior to lysis in TNE.

Purification of CLN5 for mass spectrometry analysis

HEK 293T cells were seeded in 5 x 15 cm dishes and transfected with a plasmid coding for CLN5-HA. 24 hours post-transfection, cells were treated with 5 mM sodium butyrate for 24h to increase protein expression. Cells were then washed with PBS and detached with PBS/EDTA (5 mM) and lysed in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) containing protease inhibitors for ~2 hours at 4 °C under gentle agitation. The lysates were clarified by centrifugation at 14 000 rpm for 30 minutes at 4 °C and the supernatant was precleared with protein-G sepharose beads for 1h. A monoclonal antibody against the HA epitope and protein-G sepharose were added to the supernatant

followed by an overnight incubation at 4 °C. The precipitate was then washed five times in lysis buffer and the proteins eluted 1 h at room temperature in 50 µl of 2X SDS-PAGE loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.5, 5% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue, 10% β-mercaptoethanol). Proteins were then resolved on SDS-PAGE and the gel colored with coomassie blue. The band with a molecular weight corresponding to mature CLN5 was cut and sent for mass spectrometry analysis.

Western blotting

HeLa cells seeded in 6-well plates were transfected with the indicated plasmids. Approximately 24 hours after transfection, cells were washed with PBS then detached with PBS/EDTA (5 mM) and lysed in TNE buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5%) containing protease inhibitors for 1 hour at 4 °C under gentle agitation. Lysates were clarified by centrifugation at 18 800 g for 15 minutes at 4 °C and the supernatants were mixed with sample buffer 4X to obtain a final concentration of 1X SDS-PAGE loading buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.5, 2.5% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue). Proteins were then resolved on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and detected by immunoblotting using the indicated antibody.

Immunofluorescence, image analysis and quantification

COS-7 or HeLa cells were grown on glass coverslips for 24 hours and co-transfected with CLN5-HA and PSAP-CLN5-myc. 24 hours post-transfection, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde in PBS for 15 min. Cells were subsequently incubated with polyclonal anti-

HA and monoclonal anti-myc antibodies at 1:1000 dilutions in 0.1% BSA, 0.5 % saponin in PBS for 2 hours. Following two 5 min washes with PBS, the cells were incubated with anti-mouse AlexaFluor 488 and anti-rabbit AlexaFluor 594 for 1h in the same buffer as above. After two 5 min washes in PBS, the coverslips were mounted on slides using Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL,) and imaged using an inverted microscope Olympus IX71 equipped with a confocal module (Thorlabs, Newton, NJ). Co-localization was assessed using the method described in (26, 27) using scripts programmed in Matlab (Mathworks, Natick, MA). First, maximum thresholds for both channels are co-dependently determined automatically so that the pixel intensity below them has positive Pearson's linear correlation coefficient. The algorithm then lowers the threshold until a minimum value is found for which the pixel intensity below has a negative Pearson's linear correlation. Finally, the co-localization is defined as the fraction of intensity in the HA channel that co-localizes with the myc channel above the intensity thresholds.

3.4 Results

HA tagged CLN5 is glycosylated and cleaved into mature CLN5

Prediction tools such as TOPCONS (<http://topcons.cbr.su.se/>) routinely find at least one transmembrane (TM) domain in CLN5 from residues 73 - 93 based on the 407 amino acid protein (Fig. 3.1A). CLN5 is first translated as a 407 amino acid protein with a predicted transmembrane domain (Fig. 3.1A, yellow box), while in lysosomes, CLN5 is found as a soluble luminal protein. In order to understand the translation and processing of CLN5, we expressed HA-CLN5 and CLN5-HA in HeLa cells and performed a Western blot (Fig. 3.1B). For HA-CLN5, we found bands slightly below 50 kDa (Fig. 3.1B, open arrowhead), slightly above 75 kDa (Fig. 3.1B, solid arrow) and slightly below 20 kDa (Fig. 3.1B, closed arrowhead). These bands correspond to uncleaved, unglycosylated CLN5 (preproCLN5, predicted molecular mass of 46.3 kDa, open arrowhead), uncleaved, glycosylated CLN5 (proCLN5, solid arrow) and the cleaved N-terminal fragment (NtfCLN5, solid arrowhead). When we expressed CLN5-HA, we found almost exclusively one band slightly above 50 kDa (Fig. 3.1B, open arrow) corresponding to cleaved and glycosylated mature CLN5 (mCLN5, open arrow) with some proCLN5 (Fig. 3.1B, solid arrow). To confirm that preproCLN5 (open arrowhead) is the unglycosylated form of CLN5, we treated samples with either EndoH or PNGase F (Fig. 3.1C). As expected, EndoH or PNGase F treatment did not affect the molecular weight of preproCLN5, whereas proCLN5 was entirely converted in preproCLN5 after deglycosylation (Fig. 3.1C). We also observed a shift in molecular weight corresponding to the deglycosylated form of the mature protein in samples containing CLN5-HA. As

predicted the band corresponding to preproCLN5 remained unchanged in all samples (Fig. 3.1C). These data suggest that HA tagged CLN5 can be glycosylated and cleaved in a similar fashion to endogenous CLN5.

CLN5 is initially translated as a type II transmembrane protein

To determine the topology of CLN5, we performed a membrane separation assay (25). Our membrane separation was successful as the integral membrane protein Lamp-2 was found almost exclusively in the membrane fraction (Fig. 3.2A) while the cytosolic protein GAPDH was found in the cytosolic fraction (Fig. 3.2A). We found that the majority of HA-CLN5 was associated with the membrane fraction while a very small amount, was present in the soluble fractions (Fig. 3.2A). This suggested that proCLN5 is membrane associated and not a cytosolic protein. Next we performed the assay using two truncated variants of CLN5 found in human disease, CLN5Y392* and CLN5W75*, which correspond to the Finnish major mutation leading to a protein of 391 amino acids (19) and Finnish minor variant of the protein, CLN5W75*, that leads to a truncated protein of only 75 amino acids (truncated prior to its predicted transmembrane domain) (19). As with wild-type protein we found that HA-CLN5Y392* was found more notably in the membrane fraction with very little found in the soluble fraction. This result suggests that the Finnish major mutant is initially translated as a transmembrane protein. In the case of the Finnish minor mutant, we found that HA-CLN5W75* was no longer associated with membranes and found most of the protein in the soluble fraction. The loss of membrane association infers that the first 75 amino acids comprised of the N-terminal region are not sufficient for CLN5 membrane interaction or for

its internalization into the lumen of organelles. Our results strongly suggest wild-type proCLN5 and proCLN5Y392* are membrane proteins. We next performed a membrane assay using CLN5-HA. As expected, in the standard assay where internal membranes are left intact, both HA-CLN5 and CLN5-HA appear membrane bound (Fig. 3.2B). However, when membranes are linearised with Na₂CO₃, a great portion of CLN5-HA is released into the soluble fraction while HA-CLN5 is not. This strongly supports our hypothesis that preproCLN5 and proCLN5 are transmembrane forms of CLN5 and that mCLN5 is a soluble protein found inside the lumen of organelles.

The literature has conflicting reports as to whether CLN5 is a cytosolic protein (21) or a transmembrane domain protein (20,21). Recently, using a topology assay on isolated microsomal fractions, CLN5 was found to contain at least 1 TM (22). To confirm these results, we performed a topology assay in perforated intact cells rather than on isolated microsomal membranes. We expressed HA-CLN5, CLN5-HA, prosaposin-myc (PSAP-myc, a soluble lysosomal protein) and sortilin-myc (a type I transmembrane protein) in HeLa cells. Following permeabilisation with digitonin, which induces pore formation in the plasma membrane but leaves internal membranes intact, the cells were incubated in cold diluted trypsin solution. As predicted, we found that prosaposin-myc (PSAP-myc) was not digested, while the cytosolic C-terminal tail of sortilin-myc was (Fig. 3.2C). We found the N-terminal tail of CLN5 was digested (Fig. 3.2C) suggesting that it was in the cytosol and therefore accessible to trypsin. Conversely, mature CLN5 appears to be a soluble protein within the lumen of organelles as it was protected from trypsin digestion (Fig. 3.2C). This data supports a model that preproCLN5

(unglycosylated) and proCLN5 (glycosylated) are type II transmembrane proteins cleaved into a mature soluble protein.

CLN5 is cleaved after residue arginine 92 to produce a soluble mature protein.

CLN5 is cleaved to produce a mature soluble protein. The exact site of cleavage has never been determined although experimental evidence points to residue 96 (8). To verify whether or not cleavage occurs at residue 96, we expressed CLN5-HA in HEK 293T cells and purified the protein using immunoprecipitation with anti-HA antibodies (Fig. 3.3A) and performed mass spectrometry analysis on the purified band. We found that CLN5 is cleaved after arginine 92 as we recovered fragments starting from residue 93. Therefore mature soluble CLN5 appears to include residues 93-407 (Fig. 3.3B) producing a 314 amino acid mature protein. To determine whether or not residue 92 served as a cleavage signal, we mutated residue 92 to produce CLN5R92A. This mutation did not affect the cleavage of CLN5 (Fig. 3.3C). We hypothesized that mutating this residue resulted in a cleavage site upstream. Therefore, we mutated arginine residues at position 99, 108 and 112. In all cases, these mutations had no effect on cleavage.

CLN5 cleavage is inhibited by (Z-LL)₂-ketone.

We (this study) and others (22) have shown that CLN5 is a type II transmembrane domain protein prior to its cleavage into a mature soluble protein. The Signal Peptide Peptidase (SPP) family of intramembrane proteases are aspartyl proteases known to cleave a variety of type II transmembrane proteins including TNF α (28,29), invariant chain (30),

British dementia protein-2 (31) and foamy virus envelope protein (32). So far 5 members have been identified in the mammalian genome (SPP, SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c and SPPL3) that all share a common conserved catalytic motif of GxGD (33). It is well known that this class of proteolytic enzymes is sensitive to the inhibitor (Z-LL)₂-ketone (29). We therefore tested the effects of (Z-LL)₂-ketone and other inhibitors on the processing of CLN5 from proCLN5 with an apparent molecular weight above 75 kDa to mature CLN5 (mCLN5) with a molecular weight above 50 kDa. We tested leupeptin (a cysteine, serine and threonine peptidases inhibitor), pepstatin (an aspartyl protease inhibitor), E64 (a cysteine protease inhibitor) and 3 concentrations of (Z-LL)₂-ketone (an inhibitor of the SPP family of proteases) in HeLa cells transfected with CLN5-HA. We found that only (Z-LL)₂-ketone prevented the cleavage of CLN5 from proCLN5 to mCLN5 as these other inhibitors had no effect (Fig. 3.4A). This suggested that the cleavage of CLN5 occurred prior to the lysosomal compartment, as these other inhibitors are known to block the activity of various lysosomal enzymes. To verify that the band appearing at 75 kDa was in fact de novo synthesized proCLN5, we performed a cycloheximide chase experiment in the presence of the inhibitor (Z-LL)₂-ketone, this time using both HA-CLN5 and CLN5-HA (Fig. 3.4B). In cells treated with cycloheximide, we found no proCLN5 suggesting that the band appearing at 75 kDa was indeed newly synthesized proCLN5 that was not processed to mCLN5. Since CLN5 was not processed in (Z-LL)₂-ketone treated cells, we hypothesized that HA-CLN5 would not be cleaved and we would therefore expect an increase in the proCLN5 at 75 kDa and a decrease in the N-terminal cleaved fragment below 20 kDa. We found an increase in proCLN5 in the cells expressing HA-CLN5 treated with the (Z-LL)₂-ketone (Fig. 3.4B), but to our surprise, we also found more of the cleaved n-terminal fragment (Fig. 3.4B), suggesting that SPP proteases could also

be involved in the cleaving and degradation of the N-terminal fragment. We next sought to determine if the cleavage of the Ntf leads to its degradation. HeLa cells transfected with HA-CLN5 were therefore treated with different concentrations or a fixed concentration for different amount of time with the proteasome inhibitor MG132. Treatment with MG132 treatment dramatically increased the expression levels of the NtfCLN5 even though it had very little effect on the preproCLN5 and proCLN5 (Fig. 3.4C, left panel). Moreover, a sizeable increase in the expression levels of the NtfCLN5 is already observable after only 30 min of MG132 treatment, showing that NtfCLN5 is rapidly degraded after its cleavage (Fig. 3.4C, right panel).

SPPL3 cleaves proCLN5 into mCLN5.

Several mutations are thought to retain CLN5 in the early secretory pathway (34). In at least 4 mutations that cause retention, the protein is still cleaved into mCLN5 suggesting cleavage occurs prior to exit from the Golgi apparatus (7). The members of the SPP family of proteases function at various intracellular locations. As such, SPP and SPPL2c are localized to the ER, SPPL2a is found in the lysosomal compartment, SPPL2b at the plasma membrane and SPPL3 is localized to the ER/Golgi apparatus (29,35). Most SPP family members require cleavage by a sheddase prior to their function (33). Based on our (Z-LL)₂-ketone data, it would appear that the first cleavage of CLN5 is performed by a member of the SPP family as cleavage from proCLN5 to mCLN5 was inhibited by (Z-LL)₂-ketone. SPPL3 has been shown to function without the requirement for prior cleavage by a sheddase (32). Therefore, in order to test whether SPPL3 is the protease implicated in cleaving proCLN5 to mCLN5, we co-

transfected HeLa cells with CLN5-FLAG (Fig. 3.5A) and either wild-type HA-SPPL2b, HA-SPPL3 or their catalytically inactive forms (HA-SPPL2bD421A and HA-SPPL3D272A). 24-hours post-transfection, we performed a Western blot using antibodies to either FLAG or HA. CLN5-FLAG was cleaved to mCLN5 in the cells co-transfected with HA-SPPL2b, HA-SPPL2bD421A and HA-SPPL3 (Fig. 3.5B). However, in cells co-transfected with HA-SPPL3D272A, we found a notable accumulation of proCLN5 not found in the other co-transfections (Fig. 3.5B). Classical signal sequences are usually 15 to 50 amino acids long (36) which are usually cleaved during translation. CLN5 does not appear to have a classical signal sequence as cleavage occurs after residue 92 and probably after insertion into the membrane since we observe both HA-CLN5 and CLN5-HA. We therefore generated a construct that switched the N-terminal portion of CLN5 with that of prosaposin (PSAP) fusing residues 1 - 28 (orange square) of prosaposin with residues 94 - 407 of CLN5 (Fig. 3.5A). PSAP is a soluble lysosomal protein whose trafficking requires sortilin (37). The N-terminal portion of PSAP contains a classical signal peptide 16 residues long cleaved from the mature protein presumably by signal peptidase during translation (38) and not SPPL3 or a related SPPL family member. First, we determined whether the PSAP/CLN5 chimera would enter the lumen of organelles. We transfected HeLa cells with PSAP-myc, PSAP/CLN5-myc and CLN5-HA. We found that all 3 constructs entered the secretory pathway, as expected, as they were localized to the membrane fraction (Fig 3.5C). Next, we tested whether PSAP/CLN5-myc was cleaved by SPPL3. We co-transfected HeLa cell with PSAP/CLN5-myc and HA-SPPL3 or HA-SPPL3D272A and found no difference in the cleavage of PSAP/CLN5-myc (Fig. 3.5D). This suggested that the classical signal peptide of the chimera was cleaved co-translationally by another mechanism, presumably signal peptidase within the ER. This supports our

hypothesis that SPPL3 cleaves CLN5 into proCLN5 and NtfCLN5 after translation and insertion into the membrane as a type II transmembrane domain (Fig. 3.5E).

The N-terminal fragment of CLN5 is not required for its intracellular localization.

Based on our work, the cleavage of CLN5 occurs prior to its exit from the Golgi apparatus by SPPL3 (Fig. 3.5). Previous studies have shown that CLN5 co-localizes with Lamp-1, a marker of late endosomes/lysosomes (8,20). The vast majority of soluble cargo proteins destined for the lysosomal compartment bind to one of the 3 known lysosomal sorting receptors (CDMPR, CIMPR and/or sortilin) prior to being packaged into clathrin-coated vesicles at the Golgi. The lysosomal sorting and trafficking of CLN5 does not appear to require either of the mannose 6-phosphate receptors (8) or sortilin (14), although the depletion of all 3 receptors simultaneously has not been tested. We wanted to determine whether or not the N-terminal portion of CLN5 was required for its lysosomal localization. We tested the ability of the PSAP/CLN5-myc (Fig. 3.6A, green) chimera to co-localize with CLN5-HA (Fig. 3.6B, red) in COS-7 and HeLa cells. COS-7 cells were chosen for their large cytoplasm, allowing for a clearer distinction between different cytoplasmic organelles. We found the PSAP/CLN5-myc chimera in the same structures as CLN5-HA (Fig. 3.6C) suggesting that the N-terminal portion of CLN5 was not required for its localization. In fact, co-localization analysis showed that CLN5-HA co-localized with PSAP/CLN5-myc 96.2% (S.D. +/- 3.1) of the time in COS-7 cells (Fig. 3.6D, black bar). Notable co-localization between CLN5-HA and PSAP/CLN5-myc was also observed in HeLa cells. Image analysis revealed that CLN5-HA co-localized with PSAP/CLN5-myc 96.1% (S.D. +/- 4.6) of the time (Fig. 3.6D, white bar).

This data suggests that CLN5 is sorted and transported to the lysosomal compartment post-cleavage by a mechanism independent of its N-terminal fragment.

3.5 Discussion

Several conclusions can be drawn from the data presented in this paper. First, we confirmed that CLN5 is initially translated as a type II transmembrane protein in intact cells and is subsequently cleaved into a mature soluble protein. Second, we demonstrate that SPPL3 mediates this cleavage after residue 92. Finally, we show that the N-terminal fragment is not implicated in the intracellular localization of CLN5.

CLN5 contains a hydrophobic region that is predicted to be a transmembrane domain between residues 73 and 93. A previous study using isolated microsomes found CLN5 is a type II transmembrane domain protein (22). We confirmed this result using a topology assay in intact cells gently permeabilised with digitonin enabling us to test the topology of CLN5 without isolating microsomes using high-speed centrifugation, leaving CLN5 in a more physiological state. We found that preproCLN5 and proCLN5 are type II transmembrane domain proteins while mature CLN5 (mCLN5) is a soluble protein within the lumen of organelles that localizes to the lysosomal compartment. The hydrophobic region (amino acids 73 - 93) may not be an actual transmembrane domain. It could serve as a signal anchor allowing the insertion of the C-terminal portion of CLN5 (amino acids 93 - 407) into the

lumen of the ER (38). Once inserted into the membrane, CLN5 would subsequently be cleaved by SPPL3. Our observation of the 2 forms of CLN5 depending on the placement of the HA tag (HA-CLN5 versus CLN5-HA) would suggest that cleavage occurs inefficiently or after translocation and membrane insertion. If cleavage is indeed inefficient, it would be possible that CLN5 as a type II transmembrane protein could have biological activity.

To identify the mechanism of cleavage of CLN5, we treated cells with a variety of inhibitors including (Z-LL)₂-ketone, which was previously shown to inhibit a class of cleavage enzymes specific for type II transmembrane proteins. Not only did the inhibitor prevent cleavage from proCLN5 to mCLN5, it also blocked the degradation of NtfCLN5. Using catalytically dead mutants of the SPPL family, we found that SPPL3 alone mediates the cleavage from proCLN5 to mCLN5 while another member(s) of the SPPL family would be responsible for cleavage and degradation of NtfCLN5. It is unclear at this point if NtfCLN5 has a cellular function but it does not appear to be implicated in the localization of CLN5 as replacing the N-terminal portion of CLN5 with the signal peptide of prosaposin, did not appear to affect its intracellular distribution. In fact, we found that CLN5-HA and PSAP/CLN5-myc co-localized more than 95% of the time within cells. However, based on our data, it appears that the Ntf of CLN5 is a signal anchor and not a classical signal peptide.

What we have not addressed is how CLN5 reaches the lysosomal compartment. Based on our data, it would appear that CLN5 is cleaved in the ER or early Golgi. Most soluble lysosomal proteins such as cathepsin D, prosaposin and GM2-activator protein use either one

of the mannose 6-phosphate receptors or sortilin to traffic to this compartment (39). However, it was recently shown that CLN5 still localizes to the lysosomal compartment in cells deficient of either the mannose 6-phosphate receptor (8) or sortilin (14), although simultaneous depletion has not been performed. Interestingly, CLN1 has been shown to restore the lysosomal localization of an ER-retained mutant CLN5 (40), suggesting it could be involved in CLN5 trafficking. LIMP-II has been shown to traffic cargo to the lysosomal compartment, so it is possible that this receptor is implicated in the sorting and trafficking of CLN5 or that some other yet to be discovered mechanism is at play. Future work will have to resolve this issue.

CLN5 represents one of the first cellular substrates identified for SPPL3 mediated cleavage. Using mass spectrometry analysis of purified mature CLN5, we were able to identify the site of cleavage after residue 92. However, point mutations of arginine residues at or in the vicinity of the cleavage site did not block CLN5 processing. Contrary to other aspartic proteases, no consensus cleavage sequence has been described for the SPP family of proteases. It has been suggested that the α -helical conformation of transmembrane domains (TMDs) hides peptide bonds from proteases and that intramembrane proteolysis requires the presence of helix destabilizing amino acids in the TMD. Indeed, reducing the α -helical content of the Bri2 TMD increases its cleavage by SPPL2b (31). We have confirmed that in contrast to other SPP proteases, SPPL3 cleaves full-length proteins without prior shedding. Consequently, its mechanism of substrate recognition is likely to differ from other SPPs and further mutational analysis is required to identify the structural determinants responsible for the cleavage specificity.

In conclusion, we have shown that SPPL3 cleaves proCLN5 into mCLN5 extending our knowledge of the biology of this protein implicated in human disease.

3.6 Acknowledgements

The authors would like to thank Peter J. McCormick (University of East Anglia) for critical reading of the manuscript and helpful discussions. The authors would like to thank Dr Regina Fluhrer (Adolf Butenandt Institute for Biochemistry, Ludwig-Maximilians University Munich) for the generous gift of the HA-SPPL2b and HA-SPPL3 constructs. Funding for this work was provided by the Canadian Institutes of Health Research operating grant (MOP-102754) to SL and the Natural Sciences and Engineering Research Council to SC. SL and SC are supported by salary awards from Fonds de recherche du Quebec - Santé. FJ is supported by an Alzheimer's Society of Canada scholarship. JM is supported by a fellowship from La nephrologie et son Impact.

3.7 Author contributions

FJ, ES, JM, SC and SL designed and planned experiments. FJ, ES, JM and KDD performed experiments. FJ, ES, SC and SL interpreted results and wrote the manuscript.

3.8 References

1. Palmer, D. N., Barry, L. A., Tyynela, J., and Cooper, J. D. (2013) NCL disease mechanisms. *Bba-Mol Basis Dis* **1832**, 1882-1893
2. Mole, S. E., Williams, R. E., and Goebel, H. H. (2005) Correlations between genotype, ultrastructural morphology and clinical phenotype in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurogenetics* **6**, 107-126
3. Siegismund, G., Goebel, H. H., and Loblich, H. J. (1982) Ultrastructure and visceral distribution of lipopigments in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Pathology, research and practice* **175**, 335-347
4. Kousi, M., Lehesjoki, A. E., and Mole, S. E. (2012) Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Hum Mutat* **33**, 42-63
5. Savukoski, M., Kestila, M., Williams, R., Jarvela, I., Sharp, J., Harris, J., Santavuori, P., Gardiner, M., and Peltonen, L. (1994) Defined chromosomal assignment of CLN5 demonstrates that at least four genetic loci are involved in the pathogenesis of human ceroid lipofuscinoses. *American journal of human genetics* **55**, 695-701
6. Klockars, T., Savukoski, M., Isosomppi, J., Laan, M., Jarvela, I., Petrukhin, K., Palotie, A., and Peltonen, L. (1996) Efficient construction of a physical map by fiber-FISH of the CLN5 region: refined assignment and long-range contig covering the critical region on 13q22. *Genomics* **35**, 71-78

7. Moharir, A., Peck, S. H., Budden, T., and Lee, S. Y. (2013) The role of N-glycosylation in folding, trafficking, and functionality of lysosomal protein CLN5. *PLoS One* **8**, e74299
8. Schmiedt, M. L., Bessa, C., Heine, C., Ribeiro, M. G., Jalanko, A., and Kyttala, A. (2010) The neuronal ceroid lipofuscinosis protein CLN5: new insights into cellular maturation, transport, and consequences of mutations. *Hum Mutat* **31**, 356-365
9. Xin, W., Mullen, T. E., Kiely, R., Min, J., Feng, X., Cao, Y., O'Malley, L., Shen, Y., Chu-Shore, C., Mole, S. E., Goebel, H. H., and Sims, K. (2010) CLN5 mutations are frequent in juvenile and late-onset non-Finnish patients with NCL. *Neurology* **74**, 565-571
10. Santavuori, P., Rapola, J., Sainio, K., and Raitta, C. (1982) A variant of Jansky-Bielschowsky disease. *Neuropediatrics* **13**, 135-141
11. Santavuori, P., Rapola, J., Nuutila, A., Raininko, R., Lappi, M., Launes, J., Herva, R., and Sainio, K. (1991) The spectrum of Jansky-Bielschowsky disease. *Neuropediatrics* **22**, 92-96
12. Pineda-Trujillo, N., Cornejo, W., Carrizosa, J., Wheeler, R. B., Munera, S., Valencia, A., Agudelo-Arango, J., Cogollo, A., Anderson, G., Bedoya, G., Mole, S. E., and Ruiz-Linares, A. (2005) A CLN5 mutation causing an atypical neuronal ceroid lipofuscinosis of juvenile onset. *Neurology* **64**, 740-742
13. Isosomppi, J., Vesa, J., Jalanko, A., and Peltonen, L. (2002) Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein. *Hum Mol Genet* **11**, 885-891
14. Mamo, A., Jules, F., Dumaresq-Doiron, K., Costantino, S., and Lefrancois, S. (2012) The role of ceroid lipofuscinosis neuronal protein 5 (CLN5) in endosomal sorting. *Mol Cell Biol* **32**, 1855-1866

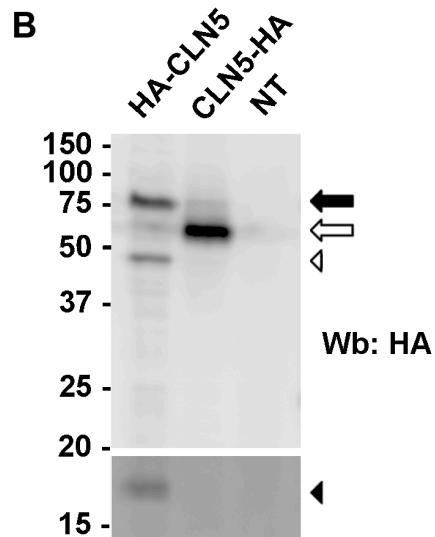
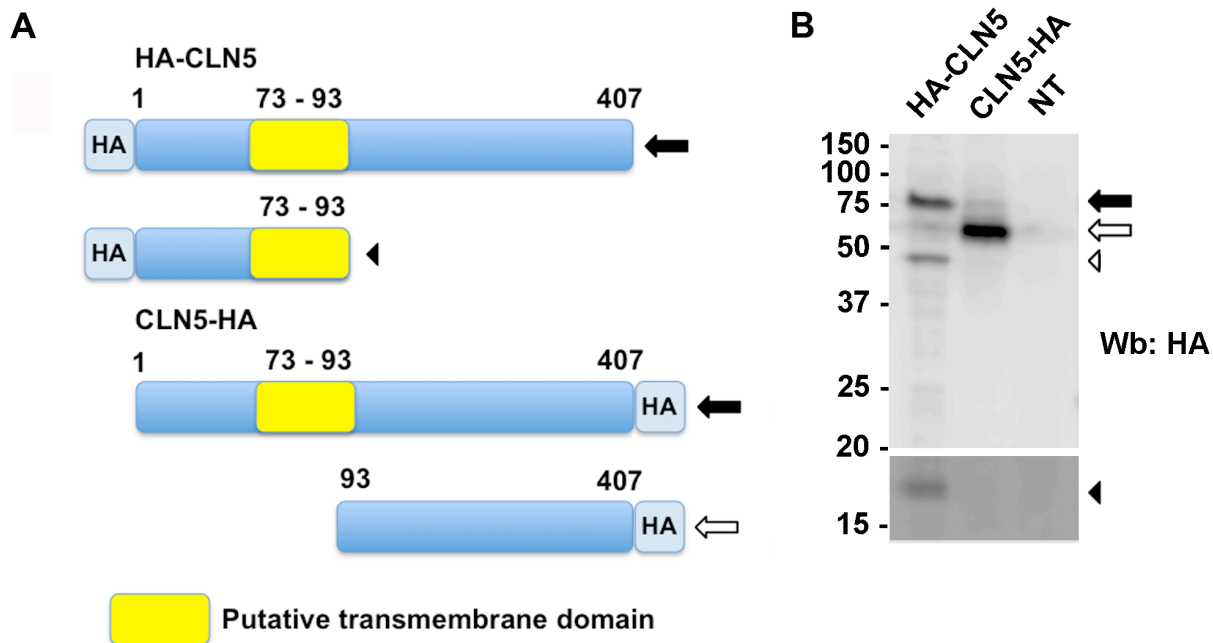
15. Arighi, C. N., Hartnell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R., and Bonifacino, J. S. (2004) Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* **165**, 123-133
16. Seaman, M. N. (2004) Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* **165**, 111-122
17. McCormick, P. J., Dumaresq-Doiron, K., Pluviose, A. S., Pichette, V., Tosato, G., and Lefrancois, S. (2008) Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking. *Traffic* **9**, 1984-1997
18. Bessa, C., Teixeira, C. A., Mangas, M., Dias, A., Sa Miranda, M. C., Guimaraes, A., Ferreira, J. C., Canas, N., Cabral, P., and Ribeiro, M. G. (2006) Two novel CLN5 mutations in a Portuguese patient with vLINCL: insights into molecular mechanisms of CLN5 deficiency. *Molecular genetics and metabolism* **89**, 245-253
19. Savukoski, M., Klockars, T., Holmberg, V., Santavuori, P., Lander, E. S., and Peltonen, L. (1998) CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature genetics* **19**, 286-288
20. Vesa, J., Chin, M. H., Oelgeschlager, K., Isosomppi, J., DellAngelica, E. C., Jalanko, A., and Peltonen, L. (2002) Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3. *Mol Biol Cell* **13**, 2410-2420
21. Holmberg, V., Jalanko, A., Isosomppi, J., Fabritius, A. L., Peltonen, L., and Kopra, O. (2004) The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glycoprotein expressed in the developing brain. *Neurobiol Dis* **16**, 29-40
22. Larkin, H., Ribeiro, M. G., and Lavoie, C. (2013) Topology and membrane anchoring of the lysosomal storage disease-related protein CLN5. *Hum Mutat* **34**, 1688-1697

23. Zhao, Q., and Morales, C. R. (2000) Identification of a novel sequence involved in lysosomal sorting of the sphingolipid activator protein prosaposin. *J Biol Chem* **275**, 24829-24839.
24. Sauvageau, E., Rochdi, M. D., Oueslati, M., Hamdan, F. F., Percherancier, Y., Simpson, J. C., Pepperkok, R., and Bouvier, M. (2014) CNIH4 interacts with newly synthesized GPCR and controls their export from the endoplasmic reticulum. *Traffic* **15**, 383-400
25. Seaman, M. N., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E., and Bright, N. (2009) Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci* **122**, 2371-2382
26. Comeau, J. W., Costantino, S., and Wiseman, P. W. (2006) A guide to accurate fluorescence microscopy colocalization measurements. *Biophysical journal* **91**, 4611-4622
27. Costes, S. V., Daelemans, D., Cho, E. H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., and Lockett, S. (2004) Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophysical journal* **86**, 3993-4003
28. Fluhrer, R., Grammer, G., Israel, L., Condrón, M. M., Haffner, C., Friedmann, E., Bohland, C., Imhof, A., Martoglio, B., Teplow, D. B., and Haass, C. (2006) A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat Cell Biol* **8**, 894-896
29. Friedmann, E., Hauben, E., Maylandt, K., Schleege, S., Vreugde, S., Lichtenthaler, S. F., Kuhn, P. H., Stauffer, D., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2006) SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol* **8**, 843-848

30. Schneppenheim, J., Dressel, R., Huttl, S., Lullmann-Rauch, R., Engelke, M., Dittmann, K., Wienands, J., Eskelinen, E. L., Hermans-Borgmeyer, I., Fluhner, R., Saftig, P., and Schroder, B. (2013) The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *The Journal of experimental medicine* **210**, 41-58
31. Fluhner, R., Martin, L., Klier, B., Haug-Kroper, M., Grammer, G., Nuscher, B., and Haass, C. (2012) The alpha-helical content of the transmembrane domain of the British dementia protein-2 (Bri2) determines its processing by signal peptide peptidase-like 2b (SPPL2b). *J Biol Chem* **287**, 5156-5163
32. Voss, M., Fukumori, A., Kuhn, P. H., Kunzel, U., Klier, B., Grammer, G., Haug-Kroper, M., Kremmer, E., Lichtenthaler, S. F., Steiner, H., Schroder, B., Haass, C., and Fluhner, R. (2012) Foamy virus envelope protein is a substrate for signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3). *J Biol Chem* **287**, 43401-43409
33. Voss, M., Schroder, B., and Fluhner, R. (2013) Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. *Biochim Biophys Acta* **1828**, 2828-2839
34. Lebrun, A. H., Storch, S., Ruschendorf, F., Schmiedt, M. L., Kytala, A., Mole, S. E., Kitzmuller, C., Saar, K., Mewasingh, L. D., Boda, V., Kohlschutter, A., Ullrich, K., Braulke, T., and Schulz, A. (2009) Retention of lysosomal protein CLN5 in the endoplasmic reticulum causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Asian sibship. *Hum Mutat* **30**, E651-661
35. Krawitz, P., Haffner, C., Fluhner, R., Steiner, H., Schmid, B., and Haass, C. (2005) Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant

- proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. *J Biol Chem* **280**, 39515-39523
36. von Heijne, G. (1986) Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *Journal of molecular biology* **189**, 239-242
37. Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M., and Morales, C. R. (2003) The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J* **22**, 6430-6437
38. Martoglio, B., and Dobberstein, B. (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**, 410-415
39. Ni, X., Canuel, M., and Morales, C. R. (2006) The sorting and trafficking of lysosomal proteins. *Histol Histopathol* **21**, 899-913
40. Lyly, A., von Schantz, C., Heine, C., Schmiedt, M. L., Sipila, T., Jalanko, A., and Kyttala, A. (2009) Novel interactions of CLN5 support molecular networking between Neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins. *BMC Cell Biol* **10**, 83

3.9 Figures



C

HA-CLN5	+	-	+	-	+	-
CLN5-HA	-	+	-	+	-	+
Endo H	-	-	+	+	-	-
PNGase F	-	-	-	-	+	+

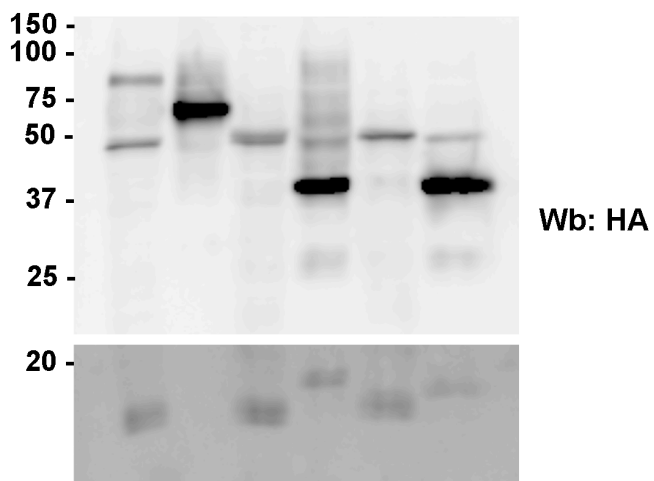


Figure 3.1 HA tagged CLN5 is cleaved and glycosylated.

(A) Schematic representation of CLN5 tagged at the N-terminal end (HA-CLN5) or the C-terminal end (CLN5-HA). Highlighted in yellow is the hydrophobic region predicted to be a possible transmembrane domain (residues 73-93). proCLN5 is represented as the full-length protein composed of 407 amino acids (solid arrow), the cleaved N-terminal fragment (NtfCLN5, solid arrow head) and mature CLN5 (mCLN5, open arrow). (B) HeLa cells were transfected with HA-CLN5 or CLN5-HA. 24 hours post-transfection, the cells were lysed in TNE and the samples run on a 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot (Wb) with an antibody against HA. The bottom of the gel was overexposed to increase the visibility of the N-terminal fragment (NtfCLN5). The solid arrow indicates proCLN5 (fully glycosylated), solid arrowhead indicates NtfCLN5, open arrow indicates mCLN5 and the open arrowhead represents preproCLN5 (unglycosylated). (C) HeLa cells were transfected with HA-CLN5 or CLN5-HA. 24 hours post-transfection, the cells were lysed in TNE and the cell lysates were treated with either EndoH or PNGase F and subsequently run on SDS-PAGE and Western blotted (Wb) with anti HA antibodies.

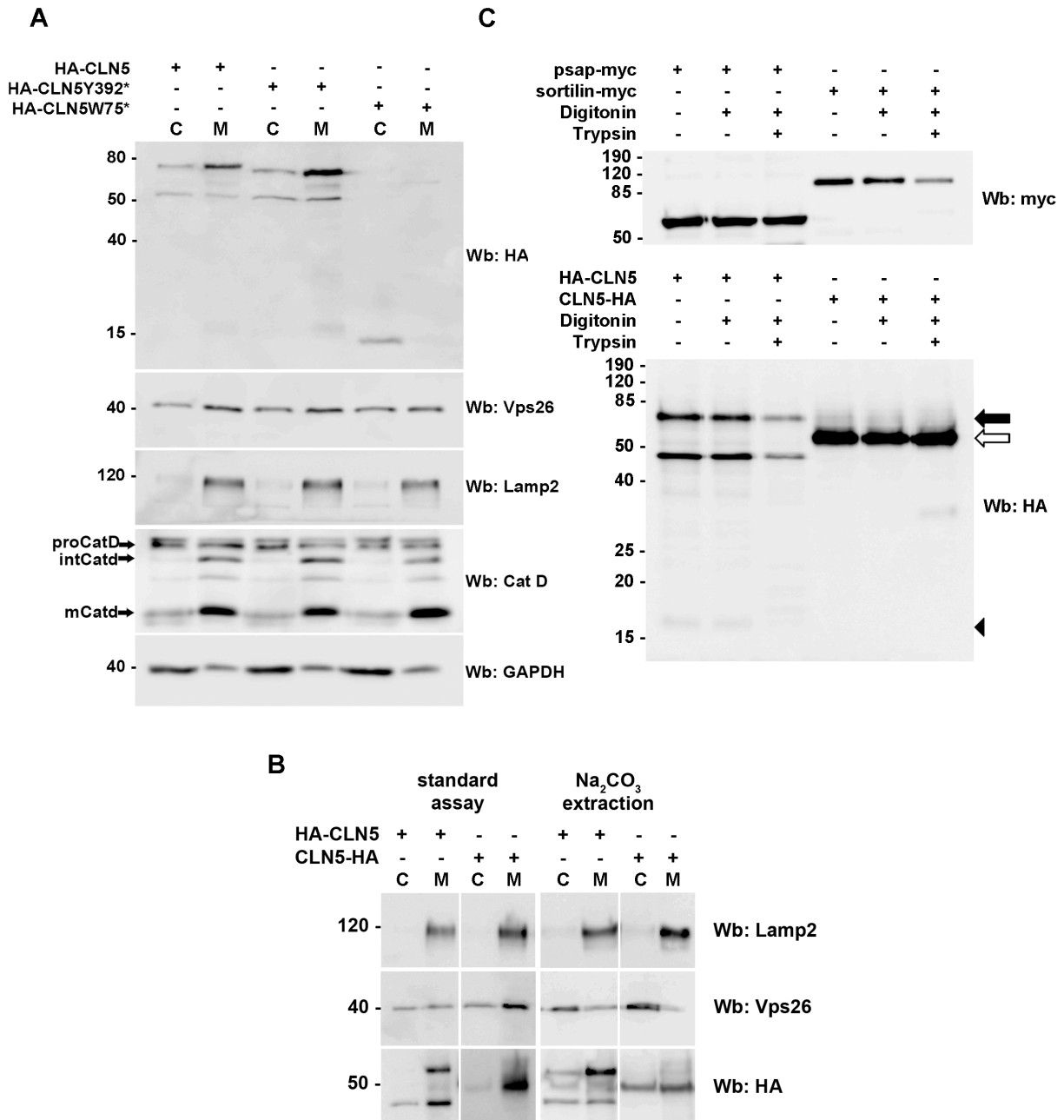
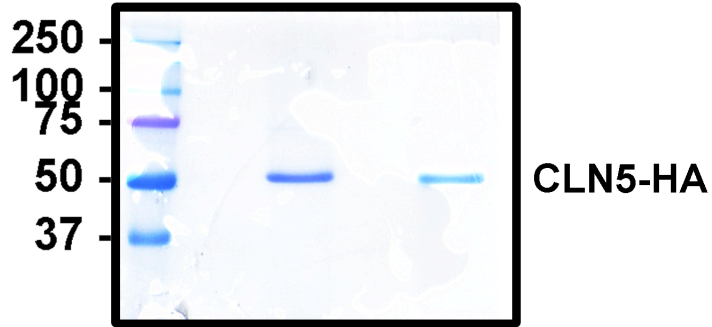


Figure 3.2 CLN5 is a type II transmembrane protein cleaved to a soluble protein.

(A) HeLa cells were transfected with HA-CLN5, HA-CLN5Y392* or HA-CLN5W75*. 24 hours post-transfection, a membrane assay (see materials and methods) was performed. Equal

volumes of cytosolic (C) and membrane fractions (M) were run on a 12% SDS-PAGE and then analyzed by Western blot (Wb). Nitrocellulose membranes were sequentially stained with the following antibodies: mono-HA, poly-Vps26 (a peripherally associated membrane protein), poly-Lamp2 (a lysosomal transmembrane protein), poly-cathepsin D (Cat D, a soluble lysosomal protein) and poly-GAPDH (a cytosolic protein) C: soluble cytosolic fraction, M: membrane fraction. (B) Cells were transfected with either HA-CLN5 or CLN5-HA and membranes were isolated by performing a sodium carbonate assay (see material and methods). Nitrocellulose membranes were sequentially stained with the following antibodies: mono-HA, poly-Vps26 (a peripherally associated membrane protein) and poly-Lamp2 (a lysosomal transmembrane protein) C: cytosolic fraction, M: membrane fraction. (C) HeLa cells were transfected with HA-CLN5, CLN5-HA, prosaposin-myc (PSAP-myc) or sortilin-myc. 24 hours post-transfection, cells were split into 3 groups. In group 1, the cells were lysed in TNE. In group 2, cells were treated with 20 mM digitonin in KHM buffer on ice for 10 min prior to lysis. In group 3, cells were treated with digitonin followed by a 30 min treatment with trypsin diluted in KHM on ice prior to lysis.

A



B

MAQEVDTAQQ	AEMRRGAGAA	RGRASWCWAL	ALLWLAVVPG
WSR VSGIPSR	RHWPVPYKRF	DFRPKPDPLYC	QAKYTF CPTG
SPTPVM EGD	DIEVFRLQAP	VWEFKYGDLL	GHLKIMHDAI
GFRSTLTGKN	YTM EWYELFQ	LGNCTFPHLR	PEMDAPFWCN
QGAACFFEGI	DDVHWKENG	LVQVATISGN	MFNQMAKWVK
QDNETGIYYE	TWNVKASPEK	GAETWFDSDYD	CSKFVLRFTFN
KLAEFGAEFK	NIETNYTRIF	LYSGEPTYLG	NETSVFGPTG
NKTLGLAIKR	FYYPFKPHLP	TKEFLLSLLQ	IFDAVIVHKQ
FYLFYNFEYW	FLPMKFPFIK	ITYEEIPLPI	RNKTL SGL

C

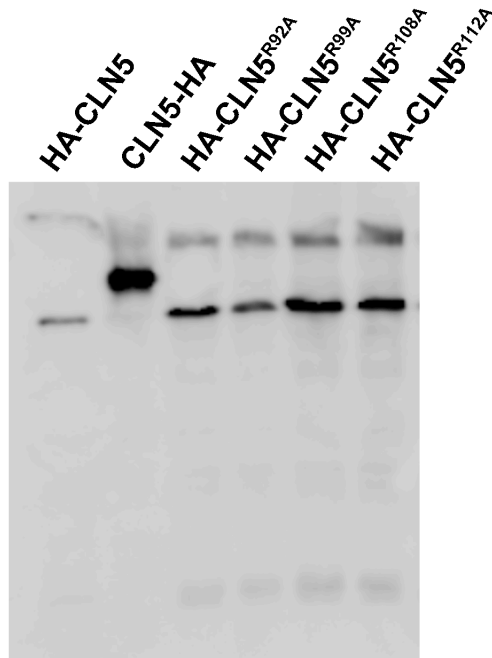


Figure 3.3 CLN5 is cleaved after residue 92.

(A) HEK 293T cells were transfected with CLN5-HA. 48 hours post-transfection, the cells were lysed in TNE and an immunoprecipitation with anti-HA antibody was performed. The post-IP protein eluted from the sepharose beads was run on SDS-PAGE and coomassie stained. (B) The band from A was cut out of the gel and sent for mass spectroscopy analysis at the proteomics facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), University of Montreal. The fragments recovered are highlighted in yellow and suggest that CLN5 is cleaved after residue 92 to produce a mature soluble protein. (C) HeLa cells were transfected with various arginine mutants of CLN5 to test if these residues were required for cleavage. 24 hours post-transfection, the cells were lysed in TNE and an SDS-PAGE was performed. Western blotting (Wb) with anti-HA was done.

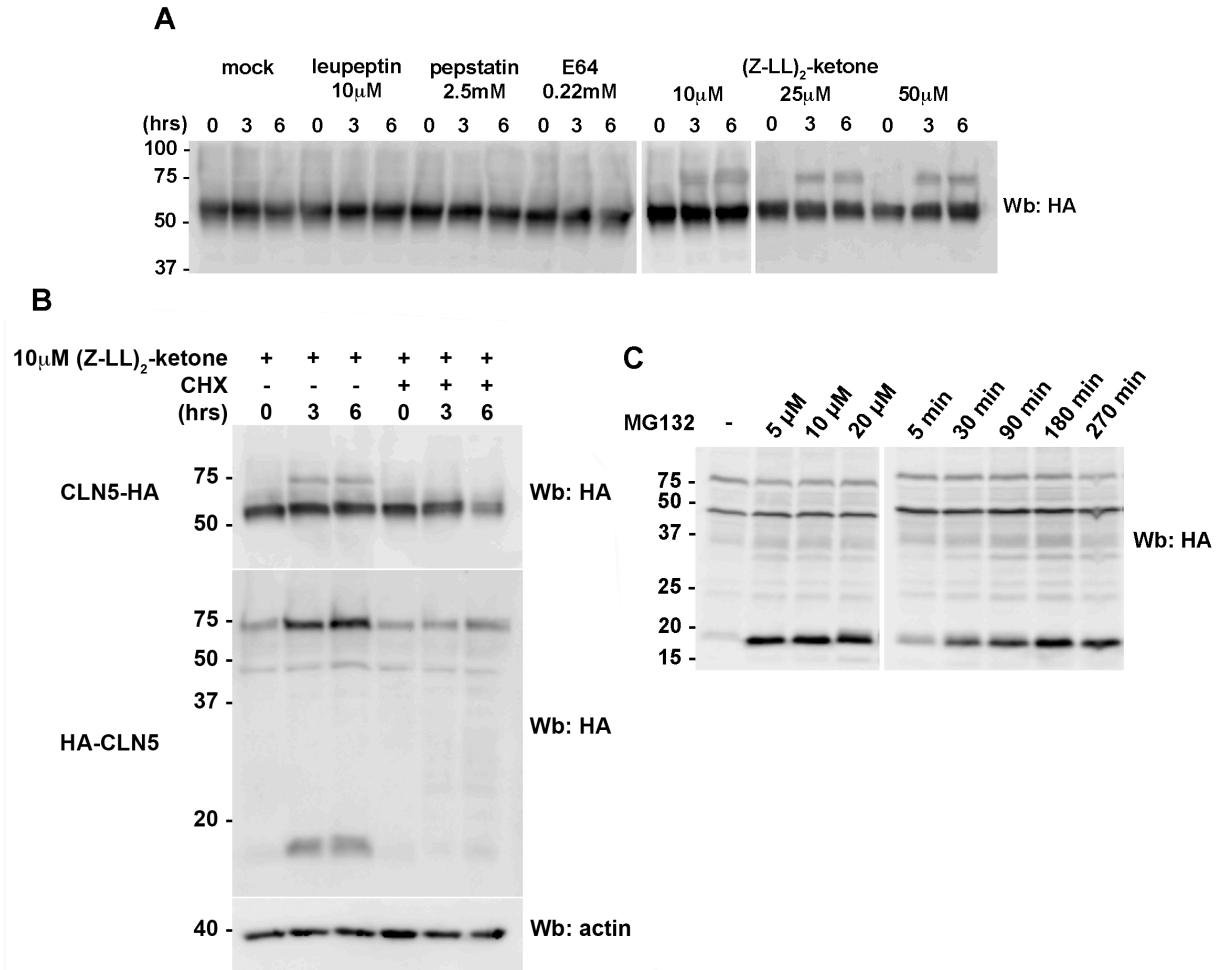


Figure 3.4 (Z-LL)₂-Ketone prevents the cleavage of proCLN5 to mCLN5.

(A) HeLa cells were transfected with CLN5-HA and subsequently treated with leupeptin, pepstatin, E64 or (Z-LL)₂-ketone at the concentration indicated for either 0, 3 or 6 hours. Following cell lysis, the lysates were run on a 12% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose and blotted (Wb) with anti-HA antibody. (B) HeLa cells were transfected with either HA-CLN5 or CLN5-HA and treated with (Z-LL)₂-ketone with or without cycloheximide for 0, 3 or 6 hours. Total cell lysate was subsequently run a 12% SDS-PAGE and Western blotted (Wb) with anti-HA or anti-actin antibody. (C) HeLa cells were transfected with HA-CLN5 and treated with the indicated concentrations of MG132 for 4 h

(left panel) or with 5 μ M MG132 for the indicated time periods (right panel). Total cell lysate was subsequently run a 12% SDS-PAGE and Western blotted (Wb) with anti-HA.

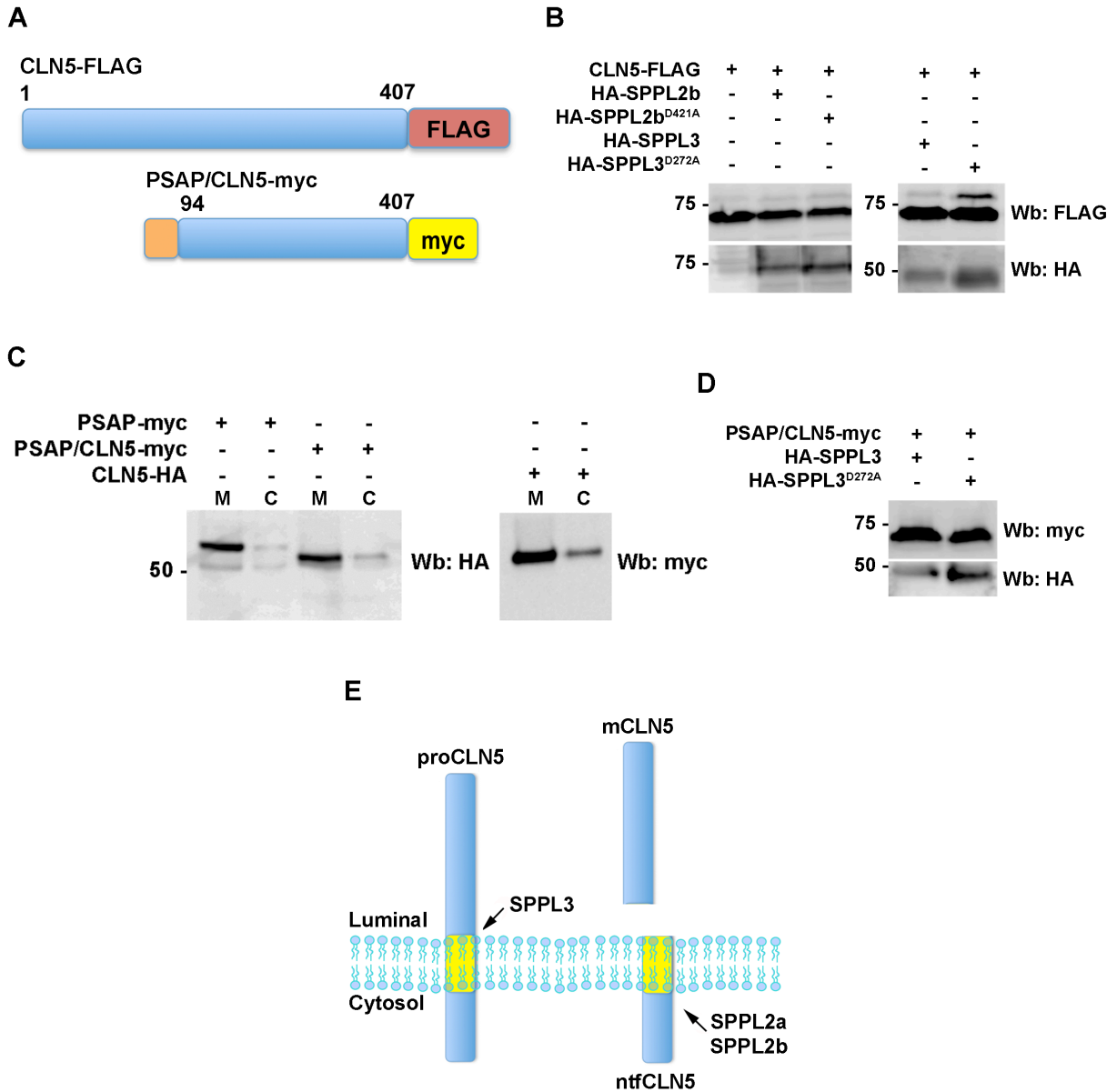


Figure 3.5 SPPL3 cleaves proCLN5 to mCLN5.

(A) Schematic representation of CLN5-FLAG and the chimeric protein PSAP/CLN5-myc that replaced the N-terminal tail of CLN5 (1 - 93) with the N-terminal portion of prosaposin (PSAP) containing a classical signal peptide (1 - 28, orange box). (B) HeLa cells were co-transfected with CLN5-Flag and HA-SPPL2b, HA-SPPL2b^{D421A}, HA-SPPL3 or HA-SPPL3^{D272A}. 24 hours post-transfection, cells were lysed in TNE and samples run on a SDS-PAGE. Western blotting (Wb) was performed with anti-FLAG and anti-HA antibodies. (B) Schematic view of the cleavage of CLN5 by SPPL3 into mCLN5 and the NtfCLN5. (C) HeLa cells were transfected with PSAP-myc, PSAP/CLN5-myc or CLN5-HA. A membrane separation assay was performed to determine their distribution. C: cytosolic fraction, M: membrane fraction. (D) HeLa cells were co-transfected with PSAP/CLN5-myc and HA-SPPL3 or HA-SPPL3^{D272A}. 24 hours post-transfection, cells were lysed and run on SDS-PAGE followed by Western blotting (Wb) with anti-myc and anti-HA antibodies. (E) Schematic representation of the cleavage of proCLN5 after membrane insertion by SPPL3 into mCLN5 and NtfCLN5.

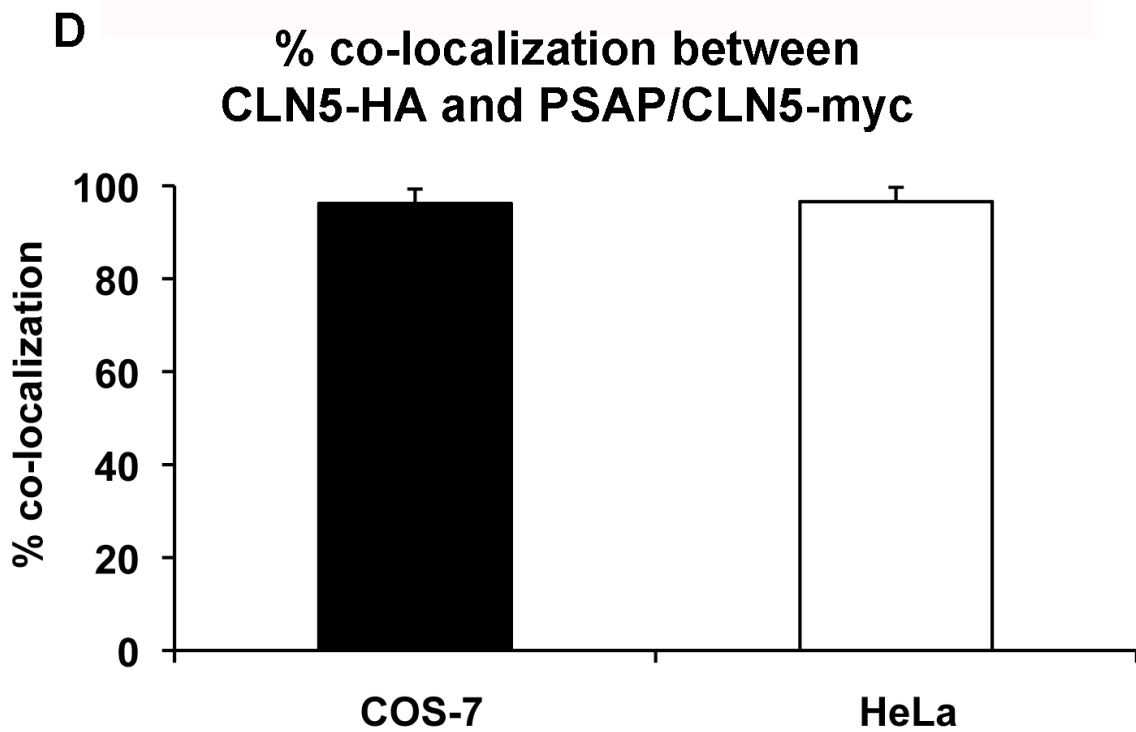
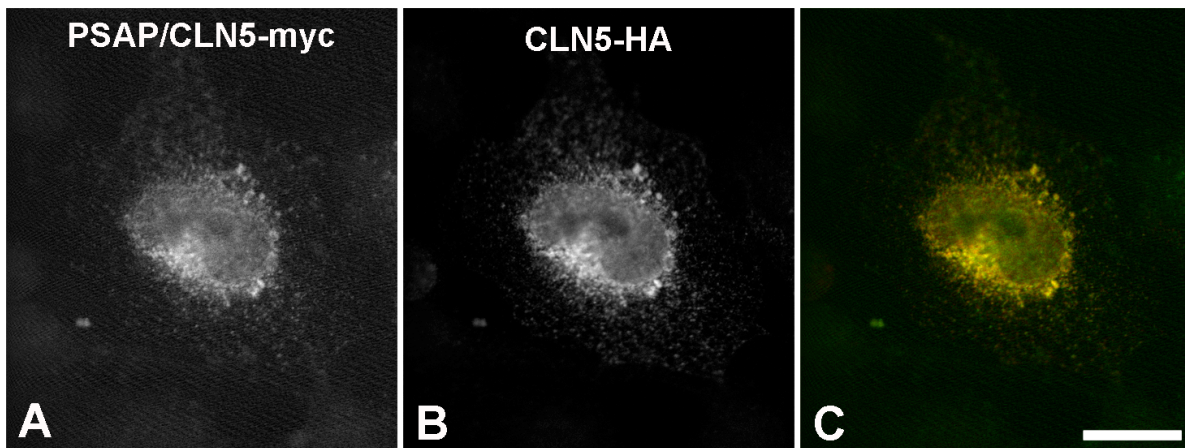


Figure 3.6 The N-terminal tail of CLN5 is not required for its localization.

(A - C) COS-7 cells grown overnight on glass coverslips were transfected with CLN5-HA and PSAP/CLN5-myc, fixed in 4% paraformaldehyde and immunostained with monoclonal anti-myc (A, green) and polyclonal anti-HA (B, red) antibodies. The merge of the image is shown

in C. Scale bar = 10 μ m. (D) Protein co-localization was quantitatively analyzed in COS-7 and HeLa cells. 44 and 41 cells were analyzed respectively. Error bar represents standard deviation.

Chapitre 4

4. Discussion

Le transport efficace des enzymes lysosomales repose sur le bon fonctionnement des récepteurs de tri vers le lysosome. Pour accomplir leur fonction adéquatement ces récepteurs doivent être recyclés à partir de l'endosome vers l'appareil de Golgi où ils peuvent à nouveau lier leur cargo et former des vésicules de transport. Le grand nombre de maladies découlant soit d'une mutation des hydrolases acides, d'un défaut de leur modifications post-traductionnelles ou de leur transport démontre l'importance du bon fonctionnement du lysosome et du mécanisme de recyclage des récepteurs pour la santé de l'organisme. L'objectif général des travaux présentés dans cette thèse visait à élucider en partie les mécanismes qu'utilise la cellule pour réguler le cycle de vie des récepteurs de tri vers le lysosome et de découvrir de nouvelles protéines importantes pour cette régulation.

Comme mentionné dans l'introduction le transport des enzymes, des protéines solubles non-enzymatique et des protéines transmembranaires devant se rendre au lysosome peut être séparer en deux étapes. La première qui est le transport antérograde consiste en l'emballage des enzymes dans des vésicules de transport qui est possible grâce aux récepteurs de tri vers le lysosome. La deuxième étape, le transport rétrograde, est la relâche des enzymes dans l'endosome suivi du recyclage des récepteurs vers l'appareil de Golgi. Les travaux présentés dans cette étude visent plus spécifiquement à comprendre le transport rétrograde qui est effectué par le complexe Retromer. Le complexe Retromer est recruté à la membrane de l'endosome après l'activation de la GTPase Rab7 [103, 113, 114]. Toutefois cette GTPase est

impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires parfois complètement opposées comme le recyclage vers le Golgi et le transport vers le lysosome. La manière dont Rab7 recrute différemment ces effecteurs pour accomplir ces fonctions n'est pas bien comprise. De plus, la palmitoylation des récepteurs est requise pour leur interaction avec le complexe Retromer [156] et cette forme de lipidation a la capacité de répartir les protéines sur des domaines membranaires à composition lipidique distincte. La combinaison de protéines permettant l'activation de Rab7 en plus de modifications post-traductionnelles permettant de ségréger les récepteurs à la surface de la membrane semble donc être un moyen efficace développé par les cellules de mammifère afin de réguler le transport des enzymes vers le lysosome et le cycle de vie des récepteurs de manière dynamique.

Pour découvrir des protéines ayant un rôle important dans le transport des enzymes vers le lysosome une revue initiale de la littérature sur les maladies lysosomales a permis d'identifier céroïdes-lipofuscinoses neuronales comme maladies intéressantes affectant la fonction du lysosome. Les céroïdes-lipofuscinoses neuronales présentent une accumulation de plusieurs types de matériaux non-dégradés dans les lipopigments. On y retrouve des sucres, des métaux et des acides gras [224, 225]. Cette caractéristique suggère fortement que les défauts ne découlent pas de l'absence de l'activité d'une seule enzyme mais d'un problème plus général affectant la fonction du lysosome. Parmi les gènes impliqués dans les NCL, *CLN5* nous a paru le plus intéressant vu le peu d'études disponibles sur la protéine. Pour étudier la fonction de *CLN5* la méthode d'ARN interférant (siRNA) a été utilisée. Cette technique permet d'observer l'effet de la réduction spécifique du niveau d'une protéine en causant la dégradation de l'ARN messager [226]. Le fait que *CLN5* ne présente pas d'homologie

significative avec d'autres protéines et que la famille des CLN est très diversifiée rendait cette méthode particulièrement intéressante vu la réduction du risque d'inhibition de la synthèse de protéines non-ciblées.

4.1 Implication de CLN5 dans le recyclage des récepteurs de tri vers l'endosome

Les recherches initiales sur CLN5, impliquée dans la variante finlandaise des céroïdes-lipofuscinoses neuronales, ont apportés peu d'informations sur la nature et la fonction de cette protéine [212, 213]. Toutefois, il avait été démontré dans des fibroblastes murins déficients en MPR que la forme murine de CLN5 pouvait être transportée d'une manière indépendante des MPR vers le lysosome [227]. Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de démontrer qu'une interaction existe entre CLN5 et le récepteur SORTILIN (voir Chapitre 2). Nous avons aussi montré que l'interaction a lieu même au pH plus acide de l'endosome ce qui signifie que CLN5 n'est pas un cargo de sortilin. La manière dont CLN5 est transporté dans la cellule demeure toujours inconnue. Cette protéine utilise probablement un récepteur de tri vers le lysosome non-conventionnel comme LIMP-II ou pourrait nécessiter l'aide d'un co-récepteur comme serglycine. L'interaction entre CLN5 et les récepteurs de tri vers le lysosome qui n'est pas sensible au pH indiquait la possibilité que CLN5 joue un rôle dans la fonction ou la stabilité de ces récepteurs. Nous avons donc diminué les niveaux de CLN5 par siRNA dans les cellules HeLa pour étudier sa fonction. Nos résultats démontrent que dans les cellules où

CLN5 était déplétée par siRNA, la cinétique de dégradation des récepteurs était similaire à celle observée dans des cellules où des sous-unités de retromer sont déplétées [228]. Ces expériences nous ont donc mené à conclure que CLN5 est important pour la fonction de retromer à l'endosome. Nous avons donc encore une fois utilisé des siRNA contre CLN5 et mesuré cette fois le recrutement des sous-unités Vps26 et Vps35 à la membrane. Nous avons pu observer que retromer était aussi moins recruté à la membrane de l'endosome dans les cellules où CLN5 est déplétée ce qui nous a permis d'établir un lien entre CLN5 et le recrutement du complexe retromer. Cette étude est à ce jour la seule démontrant une fonction de CLN5.

4.2 Rôle de CLN5 sur l'activation de Rab7

Nos résultats sur le rôle de CLN5 dans le recrutement de retromer nous ont poussé à vouloir comprendre plus en détails comment cette protéine effectue cette tâche. Des études avaient auparavant démontré que l'activation de la GTPase Rab7 est requise pour le recrutement des sous-unités Vps du complexe retromer [113, 114]. Nous avons donc déplété CLN5 dans des cellules HeLa et mesuré par immunofluorescence le recrutement de Rab7 à la membrane. Nous avons utilisé pour ces expériences un algorithme permettant de traiter rapidement plusieurs images afin d'obtenir une grande quantité de données ce qui permet d'observer des variations faibles mais significatives. Nos résultats ont montrés que l'on retrouve 40 % moins de la GTPase Rab7 aux membranes de cellules où CLN5 est absent. Puisque que Rab7 n'est pas uniquement présent à la membrane de l'endosome où retromer est

recruté mais aussi aux lysosomes ces résultats soutiennent l'hypothèse que CLN5 est uniquement impliquée pour le recrutement de Rab7 lorsque le complexe retromer est l'effecteur qui lie la GTPase activée. Nos expériences montrent aussi une légère diminution du recrutement de la GTPase Rab5 (Figure 2.8 O). Rab5 est présent à l'endosome précoce et des travaux ont montré que cette GTPase agit en amont de l'activation de Rab7 pour la formation des endosomes tardifs avant le recrutement de retromer [229]. Nos résultats suggéraient donc la possibilité que CLN5 pourrait agir comme protéine d'échafaudage permettant le recrutement de Rab7.

Afin de vérifier si CLN5 est effectivement en complexe avec Rab7 et Rab5 nous avons utilisé les constructions HA-CLN5 et RFP-Rab7 et RFP-Rab5. Nous avons pu démontrer par co-immunoprécipitation que RFP-Rab7 peut faire parti d'un complexe avec les protéines HA-CLN5 et RFP-Rab5 (Figure 2.9). Pour savoir si CLN5 est un effecteur de Rab7 qui est recruté après son activation nous avons utilisé les mutant constitutivement actif RFP-Rab7Q67L et constitutivement inactif RFP-Rab7T22N. Les expériences de co-immunoprécipitations ont permis de constater que CLN5 était co-immunoprécipité avec les deux mutants de Rab7. Nous avons donc pu conclure que Rab7 ne doit pas nécessairement être activée pour l'interaction avec CLN5. Puisque CLN5 pouvait interagir avec Rab7 avant son activation nous avons voulu savoir si cette protéine était nécessaire pour l'activation de Rab7.

RILP est un effecteur de Rab7 dont la région exacte interagissant avec la GTPase activée est bien décrite [230]. Nous avons utilisé une protéine recombinante contenant les

acides aminés 230 à 299 de RILP couplé à la GST afin de mesurer la quantité de Rab7 activé dans des cellules où CLN5 est supprimé. Nos résultats ont montré que dans les cellules déplétées de CLN5 RFP-Rab7 liait moins GST-RILP₂₃₀₋₂₉₉ (Figure 2.9 F). De plus, en utilisant un analogue du GTP non-hydrolysable couplé à la biotine nous avons pu établir que lorsque CLN5 est déplétée par siRNA on retrouve aussi une moins grande quantité de Rab7 activée dans la cellule (Figure 2.9 C et D). Le fait que la délétion de CLN5 diminue la quantité de Rab7 activée sans complètement abolir son activation concorde avec l'hypothèse que CLN5 permet d'activer Rab7 pour le recrutement de retromer mais n'est pas nécessairement impliquée dans l'activation de cette GTPase pour ses autres fonctions dans la cellule. Ces conclusions sont aussi supportées par le fait que la délétion de Rab7 ne mène pas à la dégradation de CI-MPR mais plutôt à son accumulation dans l'endosome [114]. Nos résultats sont plutôt semblables à ceux observés lorsque le complexe retromer est déplété et que la voie de dégradation dans vers le lysosome est maintenue [228, 231].

Vu les fonctions possibles des protéines interagissant avec les Rabs en amont de leur activation une fonction de GDF ou de GEF était alors possible pour CLN5 (voir Figure 1.7). Le complexe Mon1-Ccz1 ayant déjà été identifié comme GEF de Rab7 et le fait que CLN5 interagit avec Rab7 indépendamment de son état d'activation excluaient cette possibilité. Ces expériences nous ont initialement amené à décrire un modèle où CLN5 interagirait avec les récepteurs de tri vers le lysosome après la dissociation du cargo (Figure 2.10). Notre modèle impliquait la possibilité d'une interaction directe entre Rab7 et CLN5 qui était supportée par les expériences de co-immunoprécipitation. Toutefois l'incertitude sur la nature de la protéine retrouvée dans la littérature ne permettait pas d'établir ce modèle définitivement.

4.3 La topologie de CLN5

Le gène *CLN5* encode une protéine de 407 acides aminés de 46 kDa [210]. Lorsque la séquence est insérée dans un programme de prédiction, une région transmembranaire est prédite près de l'extrémité N-terminale. La protéine contient aussi 8 sites de glycosylation qui lui donnent un poids observé d'environ 70 kDa [232]. Lorsque nous avons commencé nos recherches sur CLN5, les informations disponibles dans la littérature sur la topologie de la protéine chez l'humain rapportaient des résultats contradictoires ne permettant pas de confirmer ou d'infirmer notre modèle [211-213]. Nous avons donc entrepris nous même de déterminer la nature exacte de cette protéine. En utilisant les protéines recombinantes HA-CLN5 et CLN5-HA nous avons pu performer des expériences pour déterminer la topologie de CLN5 en utilisant la digestion par la trypsine. Cette technique utilise la digitonine afin de perméabiliser la membrane plasmique et ensuite il est possible d'utiliser de la trypsine froide à faible concentration afin de digérer les protéines qui ne sont pas protégées par la membrane d'un compartiment intracellulaire [233]. Nous avons pu conclure par cette méthode que CLN5 est effectivement synthétisé en protéine transmembranaire et que son extrémité N-terminale était dans le cytoplasme puisque l'épitope HA était digérée. Par contre, lorsque CLN5-HA est exposé à la trypsine on ne remarque pas de changement du poids de la protéine par rapport au contrôle sans trypsine (Figure 3.2). Ces résultats nous ont amené à conclure que CLN5 est traduite en protéine transmembranaire de type II. Le mode classique de traduction des protéines transmembranaires de type II suggère que la séquence en N-terminale de CLN5 est un signal pour la translocation au réticulum endoplasmique et qu'après l'inversion pour que la

protéine est la bonne orientation et les étapes de glycosylation le signal est clivé [234]. La protéine CLN5 mature est donc soluble ce qui concorde avec ce qui était rapporté chez la souris [235] et après le début de nos recherches [236]. Les études rapportant une protéine transmembranaire utilisaient un méthode de traduction in vitro de la protéine ce qui implique qu'elle ne pouvait pas être clivée.

Nous avons aussi confirmé que CLN5 est glycosylée de manière co-traductionnelle en traitant des lysats de cellules HeLa transfectées avec HA-CLN5 ou CLN5-HA avec l'endonucléase H (endo H) ou la Peptide-N-glycosidase F (PNGase F). Dans les deux cas la forme de poids moléculaire supérieure de HA-CLN5 était déglycosylée pour revenir au poids de la forme de novo traduite de la protéine tandis que le poids de la forme mature de CLN5-HA tombait à environ 37 kDa (Figure 3.1 C).

4.4 CLN5 est clivé par SPPL3

Pour connaître le site de clivage de CLN5 nous avons utilisé la méthode de séquençage par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi pu déterminer que le clivage se situe après l'arginine 92 (Figure 3.3). Ceci concorde avec le poids moléculaire du fragment retrouvé après le clivage de HA-CLN5 qui est d'environ 15 kDa et suggère un fragment de taille supérieur au 20 à 25 acides aminés normalement reconnu par la signal peptide [31].

Récemment une famille de protéases aspartiques clivant spécifiquement les protéines transmembranaires de type II a été identifiée, la peptidase de peptide signal et les semblables à la peptidase de peptide signal (SPP/SPPL) [237-239]. La famille SPP/SPPL est hautement conservée chez les eucaryotes mais le nombre de représentants retrouvés à travers les espèces varie beaucoup [240]. Chez les mammifères on retrouve cinq représentants de cette famille, SPP, SPPL2a, SPPL2b, SPPL2c et SPPL3 [241]. En utilisant le 1, 3-di-(N-carboxybenzoyl-L-leucyl-L-leucyl) amino acetone ((Z-LL)₂-ketone), un inhibiteur des peptidases de peptide signal, nous avons pu empêcher le clivage de CLN5 (Figure 3.3). Nous avons démontré qu'un autre membre de la famille SPP/SPPL, SPPL3 peut cliver CLN5. SPPL3 est situé au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi et contrairement aux autres membres de la famille SPP/SPPL reconnaît des substrats n'ayant pas d'abord été clivés par la signal peptidase [240, 242, 243]. Il a été démontré que cette enzyme peut cliver la protéine de l'enveloppe du virus moussesux humain (FVenv) et de manière intéressante ce clivage peut même avoir lieu sur la forme pro-FVenv qui est beaucoup plus longue [244]. Nos résultats suggèrent donc un mécanisme de clivage complexe de CLN5 qui débute par l'action de SPPL3 pour relâcher la partie cytosolique du peptide signal. Ensuite SPPL2a ou SPPL2b peuvent cliver la partie intramembranaire du signal pour mener à sa dégradation. L'ensemble de ces résultats nous permet donc de corriger notre modèle déjà publié pour tenir compte du fait que CLN5 étant une protéine soluble elle ne peut pas interagir directement avec Rab7.

4.5 Les interactions de CLN5

Des études ont montré que CLN5 peut interagir avec les protéines CLN1, CLN2, CLN3, CLN6 et CLN8 [211, 227, 245, 246]. CLN1 et CLN2 étant des hydrolases lysosomales il est possible que les interactions rapportées dans ces études résultent du fait que leur transport vers le lysosome est régi par les récepteurs de tri. CLN6 et CLN8 sont des protéines transmembranaires localisées au réticulum endoplasmique dont les fonctions exactes sont inconnues [247]. Toutefois, CLN8 fait partie de la superfamille des protéines ayant un domaine TRAM–Lag1p–CLN8 (TLC) et ces protéines sont impliquées dans la translocation au réticulum endoplasmique de protéines membranaires [248]. Il se peut donc que CLN6 et CLN8 soient plutôt importants lors de la synthèse de CLN5 pour son entrée et sa sortie du réticulum endoplasmique. CLN1 est une thioestérase soluble et CLN3 est une protéine transmembranaire dont la fonction exacte n'est pas connue. Toutefois il a été démontré que lorsque CLN3 est déplété le positionnement des endosomes et des lysosomes est affecté [249]. Chez la levure CLN3 est requis pour le transport au lysosome de la carboxypeptidase Y et le transport vers l'endosome de VPS10 l'homologue de SORTILIN [250]. De plus, la délétion de CLN3 dans des cellules HeLa entraîne la rétention de CI-MPR au réseau trans golgien ce qui démontre l'importance de cette protéine pour le transport vers le lysosome [251]. En support direct des résultats présentés ici une étude a aussi démontré une interaction entre CLN3 et Rab7 [252]. CLN5 et CLN3 peuvent donc agir conjointement pour retirer les enzymes qui sont couplées aux récepteurs pour par la suite recruter Rab7 et le complexe retromer et les recycler.

4.6 Le rôle de la palmitoylation

Un de nos objectifs était d'étudier les modifications post-traductionnelles pouvant permettre à la cellule de réguler le tri à l'endosome et la durée de vie des récepteurs de tri. Notre laboratoire a démontré dans le passé que sortilin est palmitoylé sur la cystéine C783 [156]. Nous avons aussi découvert que la palmitoylation de sortilin et CI-MPR étaient nécessaires pour leur permettre d'interagir avec le complexe retromer et de ne pas être dégradés [156]. Nous avons par la suite montré plus spécifiquement que lorsque Sortilin n'est pas palmitoylée elle est ubiquitinée avant d'être dégradé dans le lysosome (voir Annexe 1). Ces découvertes nous ont amené à formuler l'hypothèse que la palmitoylation est un moyen qu'utilise la cellule pour séquestrer les protéines devant être recyclées de celles devant se rendre au lysosome.

L'un des effets de la palmitoylation est la répartition des protéines palmitoylées dans des domaines membranaires de compositions lipidique différente qui sont plus résistants aux détergents nommés radeaux lipidiques ou « lipid raft » [253]. Les radeaux lipidiques sont formés de régions enrichies en cholestérol et en sphingolipides [254] et ils jouent des rôles dans les voies de signalisation, certaines voies de transport et l'endocytose [254, 255] ce qui les distribue à la membrane plasmique aux endosomes et aux lysosomes [256]. Sachant que les récepteurs étaient palmitoylés nous avons donc essayé de déterminer si d'autres protéines interagissant avec eux étaient palmitoylées aussi. En parcourant d'abord la littérature nous avons pu trouver des études démontrant la palmitoylation de certains homologues des Rabs

chez la levure, Ypt1 et Ypt3 [257, 258]. Nous avons donc décidé de tester si l'homologue de Rab7 chez la levure, Ypt7 pouvait être palmitoylé. Pour ce faire nous avons utilisé la levure *S. cerevisiae* et la méthode in vitro d'échange acyle-biotine qui remplace les résidus palmitates sur les protéines par un composé biotinylés qui dans ce cas-ci est le BMCC-biotin [259] (Figure A2.1 A). Nous avons ainsi pu détecter un signal de palmitoylation de Ypt7 qui était absent lorsque l'hydroxylamine (NH₂OH) n'était pas utilisée pour cliver les résidus de palmitates (Figure A2.1 B). Ypt7 chez la levure est aussi impliqué dans le recrutement de retromer et la fusion des vésicules avec la vacuole [260]. Ces résultats nous ont amené à étudier si l'absence de palmitoylation chez la levure pouvait affecter le transport des hydrolases acides.

Il existe seulement sept DHHC chez la levure contrairement aux 25 retrouvées chez l'homme [162]. Nous avons donc obtenu pour cette expérience des souches de levures *S. cerevisiae* délétées pour chacune des sept DHHC connus dans cet organisme. Nous avons ensuite mesuré avec un anticorps spécifique la sécrétion de CPY qui est une enzyme de la vacuole. Cette enzyme est sécrétée lorsque le système de transport intracellulaire de la levure est perturbé. Cet essai nous a permis de détecter la sécrétion de CPY dans les souches qui étaient déplétées de l'« ankyrin repeat-containing protein 1 » (akr1) et la « spore wall formation protein 1 » (swf1). Akr1 a été localisé à la membrane plasmique et l'appareil de Golgi et est impliqué dans la régulation de l'endocytose, le ciblage des protéines et les voies de signalisation [261-263]. On retrouve Swf1 sur la membrane du réticulum endoplasmique et dans des structures ponctuelles. Cette palmitoyltransférase régule l'exocytose et la formation des vacuoles [264-266]. La localisation de ces palmitoyltransférases en font de mauvaises

candidates pour la palmitoylation observée de Ypt7 mais la possibilité demeurait qu'elles palmitoylaient d'autres protéines importantes pour le transport de CPY vers la vacuole. Nous avons donc mesuré le recrutement à la membrane du complexe retromer chez la levure en utilisant un essai de séparation membranaire et avons observé qu'en l'absence de ces 2 palmitoyltransférases la sous-unité Vps35 est moins recrutée aux membranes des souches de levure délétés en *akr1* et en *swf1* (Figure A2.2 B). De plus lorsque nous avons mesuré le recrutement à la membrane de Ypt7 nous avons aussi détecté une diminution du recrutement dans les souches délétés en *akr1* et en *swf1* (Figure A2.2 C). Finalement nous avons mesuré la quantité de Vps10p présent dans les cellules après des traitements de différentes durées de cycloheximide et avons remarqué une dégradation plus rapide de Vps10p dans les levures délétés de *akr1* et *swf1* (Figure A2.2 D). Cette dégradation concorde avec les observations déjà rapportées que le complexe retromer est requis pour maintenir Vps10p chez la levure [105, 109].

4.7 Rab7 est palmitoylée chez les mammifères

Nos résultats prometteurs chez la levure nous ont amené à vérifier si la palmitoylation de Ypt7 était conservée chez l'homme. Nous avons donc exprimé RFP-Rab7 dans des cellules HeLa et performé une expérience d'échange acyle-biotin. Nous avons ainsi pu détecter que RFP-Rab7 est palmitoylé comme son homologue chez la levure (Figure A2.3 A). En utilisant des mutants RFP-Rab7C205S, RFP-Rab7C207S et le double-mutant RFP-Rab7C205, 207S nous avons montré que chacune des deux cystéines en C-terminal de Rab7 pouvait être palmitoylées puisque le signal ne disparaît que lorsqu'elles sont toutes les deux mutées (Figure A2.3 A).

La détection du signal de palmitoylation de Rab7 nous a mené à vouloir identifier la palmitoyltransférase qui pouvait être responsable de la palmitoylation. Nous avons donc co-exprimé RFP-Rab7 avec chacun des DHHC portant l'épitope HA en N-terminal (HA-DHHC1 à HA-DHHC25) puis immunoprécipité Rab7 avec un anticorps HA monoclonal et vérifié la co-immunoprécipitation de Rab7 par Western blot avec un anticorps contre RFP. Nos résultats montrent que RFP-Rab7 peut être en complexe avec les palmitoyltransférases DHHC1 et DHHC8 (Figure A2.4). Très peu d'études sont disponibles sur les DHHC et le manque d'anticorps spécifique mène à l'utilisation de protéines recombinantes comme celles utilisées ici pour les études. Ainsi DHHC-1 a été localisé au réticulum endoplasmique et DHHC-8 à l'appareil de Golgi mais seulement après avoir été surexprimé de façon à la rendre détectable

ce qui n'exclue pas la possibilité qu'ils puissent être présent sur de plus petits compartiment comme l'endosome [263].

Après avoir identifié DHHC1 et DHHC8 comme palmitoyltransférases pouvant interagir avec Rab7 nous avons voulu voir si la délétion de ces enzymes pouvait affecter la palmitoylation de Rab7. Nous avons utilisé des ARN interférents pour dépléter DHHC1 et DHHC8 et la technique récemment développée de « Click chemistry » pour mesurer le niveau de palmitoylation de RFP-Rab7 dans des cellules HeLa. La Click chemistry permet d'introduire un palmitate ayant un groupe alcyne que la cellule peut utiliser et qui peut ensuite être détecté in vitro par une réaction qui lie le palmitate à une molécule biotinylée contenant un groupement azoture. De cette manière nous avons pu montrer que lorsque DHHC1 et DHHC8 sont délétés dans des cellules HeLa la palmitoylation de Rab7 est réduite (Figure A2.5). Nous avons aussi constaté en utilisant un siRNA contre la RGGTase qui est l'enzyme qui est responsable de la prénylation des Rabs que Rab7 est encore plus palmitoylé en son absence. Ce résultat suggère que la palmitoylation pourrait être une modification en compétition avec la prénylation dans les cellules de mammifères. Cette possibilité est supportée par le fait que les mutations de la RGGTase ne sont pas létaux et que plusieurs présentent une faible affinité pour cette enzyme [267]. Il est aussi possible que la cellule utilise cette forme de modification pour compenser l'absence de prénylation.

Nous avons ensuite voulu savoir si DHHC1 et DHHC8 étaient importants pour le recyclage des récepteurs de tri vers le lysosome. Nous avons donc encore une fois déplété ces

enzymes dans des cellules HeLa par siRNA et regarder la vitesse de dégradation de CI-MPR en traitant les cellules avec du cycloheximide à différents temps. Similairement à ce que nous avons observé avec Vps10p chez la levure, CI-MPR était plus rapidement dégradé dans les cellules où DHHC1 et DHHC8 étaient délétés avec un effet plus remarquable pour DHHC8 (Figure A2.6). Ceci suggère que la palmitoylation est un processus nécessaire pour préserver les récepteurs de tri vers le lysosome et leur permettre d'interagir avec le complexe retromer. Des expériences subséquentes seront nécessaires pour confirmer que le rôle de DHHC1 ou DHHC8 est de palmitoyler Rab7 ou une autre protéine importante pour le recyclage afin de permettre l'entrée dans les radeaux lipidiques et l'interaction avec le complexe retromer. Les méthodes actuelles ne permettent pas d'observer les radeaux lipidiques dans les cellules et encore moins à la membranes de petits compartiments comme les endosomes et les lysosomes. Notre modèle suggérant la séquestration des protéines devant être recyclées peut donc difficilement être démontré expérimentalement mais le développement rapide des technologies de microscopie de super-résolution et de marquage des protéines pourrait permettre de confirmer cette hypothèse très bientôt.

Conclusion

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis d'identifier une nouvelle protéine jouant un rôle dans le transport des enzymes vers le lysosome. La protéine CLN5 est nécessaire pour le recrutement et l'activation de la GTPase Rab7 qui par la suite permet le recrutement du complexe retromer qui recycle les récepteurs de tri vers le lysosome comme sortilin et CI-MPR. Lorsque cette protéine est mutée le recyclage des récepteurs est perturbé ce qui cause leur dégradation dans le lysosome. À long terme ce défaut de recyclage des récepteurs cause l'accumulation des matériaux dégradés normalement par les enzymes qu'ils transportent. Nos travaux sur la topologie de CLN5 ont permis d'établir que la protéine mature est clivée au réticulum endoplasmique par la peptidase de peptide-signal SPPL3. Ce clivage produit une protéine mature soluble dont la fonction sur le recyclage des récepteurs nécessite d'autres partenaires dont CLN3 fait probablement parti. Le rôle exact de CLN3 dans ce mécanisme reste encore à être élucidé mais il est possible qu'en lien avec CLN5 il reconnaisse les récepteurs ou certaines des enzymes qui y sont liées et aide à la relâche de ces enzymes. De plus nous proposons un modèle où les protéines devant être recyclées vers l'appareil de Golgi à partir de l'endosome tardif sont séquestrées dans des radeaux lipidiques. Cette séquestration est possible grâce à la palmitoylation des protéines. Nous avons en effet montré la palmitoylation conservée chez la levure et les mammifères de Ypt7/Rab7. Nous avons aussi identifiées des palmitoyltransférases importantes pouvant palmitoyer Rab7 et qui sont importantes pour la stabilité des récepteurs de tri vers le lysosome.

Nos travaux ont fait avancer considérablement les connaissances sur le transport des enzymes vers le lysosome en élucidant une partie du mécanisme de recyclage des récepteurs de tri vers le lysosome par le complexe retromer. En identifiant le rôle de CLN5 dans ce mécanisme et en décrivant le processus de maturation de cette protéine, nos travaux ouvrent la voie vers de nouvelles stratégies de thérapie pour les personnes atteintes de céréïdes-lipofuscinoses neuronales. Nos travaux futurs porteront sur la fonction possible du complexe CLN3/CLN5 au lysosome où ces protéines se retrouvent après avoir permis le recyclage des récepteurs.

Références

(Introduction et discussion)

1. de Duve, C., *My love affair with insulin*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 21679-88.
2. Berthet, J., et al., *Tissue fractionation studies. II. The nature of the linkage between acid phosphatase and mitochondria in rat-liver tissue*. Biochem J, 1951. **50**(2): p. 182-9.
3. Appelmans, F. and C. De Duve, *Tissue fractionation studies. 3. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles*. Biochem J, 1955. **59**(3): p. 426-33.
4. Appelmans, F., R. Wattiaux, and C. De Duve, *Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver*. Biochem J, 1955. **59**(3): p. 438-45.
5. Berthet, J. and C. De Duve, *Tissue fractionation studies. I. The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat-liver tissue*. Biochem J, 1951. **50**(2): p. 174-81.
6. Saftig, P., *Physiology of the lysosome*, in *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, A. Mehta, M. Beck, and G. Sunder-Plassmann, Editors. 2006: Oxford.
7. Morcavallo, A., et al., *Ligand-mediated endocytosis and trafficking of the insulin-like growth factor receptor I and insulin receptor modulate receptor function*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 220.
8. Brooks, D.A., *The endosomal network*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2009. **47 Suppl 1**: p. S9-17.

9. Freeman, S.A. and S. Grinstein, *Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton*. Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 193-215.
10. Shea, L. and N. Raben, *Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2009. **47 Suppl 1**: p. S42-7.
11. Abrams, A. and P.P. Cohen, *Fractionation studies on the cytoplasmic proteins of human lymphoid tissue*. Fed Proc, 1948. **7**(1 Pt 1): p. 140.
12. Lubke, T., P. Lobel, and D.E. Sleat, *Proteomics of the lysosome*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(4): p. 625-35.
13. Schroder, B.A., et al., *The proteome of lysosomes*. Proteomics, 2010. **10**(22): p. 4053-76.
14. Sleat, D.E., M. Jadot, and P. Lobel, *Lysosomal proteomics and disease*. Proteomics Clin Appl, 2007. **1**(9): p. 1134-46.
15. Coffey, J.W. and C. De Duve, *Digestive activity of lysosomes. I. The digestion of proteins by extracts of rat liver lysosomes*. J Biol Chem, 1968. **243**(12): p. 3255-63.
16. Forgac, M., *Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 917-29.
17. Steinberg, B.E., et al., *A cation counterflux supports lysosomal acidification*. J Cell Biol, 2010. **189**(7): p. 1171-86.
18. Graves, A.R., et al., *The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes*. Nature, 2008. **453**(7196): p. 788-92.
19. Braun, A.P., *Identification of ClC-7 as a major pathway for Cl⁻ movement in lysosomes*. Channels (Austin), 2008. **2**(5): p. 309.

20. Grabe, M. and G. Oster, *Regulation of organelle acidity*. J Gen Physiol, 2001. **117**(4): p. 329-44.
21. Cutler, D.F., *Introduction: lysosome-related organelles*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(4): p. 261-2.
22. Dell'Angelica, E.C., et al., *Lysosome-related organelles*. FASEB J, 2000. **14**(10): p. 1265-78.
23. Orlow, S.J., *Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(1): p. 3-7.
24. Griffiths, G.M. and Y. Argon, *Structure and biogenesis of lytic granules*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **198**: p. 39-58.
25. Saftig, P. and J. Klumperman, *Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(9): p. 623-35.
26. Walter, P., R. Gilmore, and G. Blobel, *Protein translocation across the endoplasmic reticulum*. Cell, 1984. **38**(1): p. 5-8.
27. von Heijne, G., *Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites*. Eur J Biochem, 1983. **133**(1): p. 17-21.
28. Walter, P. and G. Blobel, *Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes*. J Cell Biol, 1981. **91**(2 Pt 1): p. 557-61.
29. Walter, P. and G. Blobel, *Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal*

- membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.* J Cell Biol, 1981. **91**(2 Pt 1): p. 551-6.
30. Walter, P., I. Ibrahimi, and G. Blobel, *Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.* J Cell Biol, 1981. **91**(2 Pt 1): p. 545-50.
31. Paetzel, M., et al., *Signal peptidases.* Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4549-80.
32. Rothman, J.E., F.N. Katz, and H.F. Lodish, *Glycosylation of a membrane protein is restricted to the growing polypeptide chain but is not necessary for insertion as a transmembrane protein.* Cell, 1978. **15**(4): p. 1447-54.
33. Ruddock, L.W. and M. Molinari, *N-glycan processing in ER quality control.* J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 21): p. 4373-80.
34. Moremen, K.W., M. Tiemeyer, and A.V. Nairn, *Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(7): p. 448-62.
35. Shailubhai, K., et al., *Glucosidase I, a transmembrane endoplasmic reticular glycoprotein with a luminal catalytic domain.* J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16587-93.
36. Stigliano, I.D., et al., *Glucosidase II and N-glycan mannose content regulate the half-lives of monoglucosylated species in vivo.* Mol Biol Cell, 2011. **22**(11): p. 1810-23.
37. Kornfeld, S., *Trafficking of lysosomal enzymes.* FASEB J, 1987. **1**(6): p. 462-8.
38. Kornfeld, S., *Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states.* J Clin Invest, 1986. **77**(1): p. 1-6.
39. Parodi, A.J., *Protein glycosylation and its role in protein folding.* Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 69-93.

40. Parodi, A.J., *Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation*. Biochem J, 2000. **348 Pt 1**: p. 1-13.
41. Winchester, B., *Role of alpha-D-mannosidases in the biosynthesis and catabolism of glycoproteins*. Biochem Soc Trans, 1984. **12(3)**: p. 522-4.
42. Duden, R., *ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review)*. Mol Membr Biol, 2003. **20(3)**: p. 197-207.
43. Stolz, A. and D.H. Wolf, *Endoplasmic reticulum associated protein degradation: a chaperone assisted journey to hell*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1803(6)**: p. 694-705.
44. Reitman, M.L. and S. Kornfeld, *UDP-N-acetylglucosamine:glycoprotein N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Proposed enzyme for the phosphorylation of the high mannose oligosaccharide units of lysosomal enzymes*. J Biol Chem, 1981. **256(9)**: p. 4275-81.
45. Pohl, S., et al., *Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases*. Biol Chem, 2009. **390(7)**: p. 521-7.
46. Lazzarino, D.A. and C.A. Gabel, *Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides*. J Biol Chem, 1989. **264(9)**: p. 5015-23.
47. Goldberg, D.E. and S. Kornfeld, *The phosphorylation of beta-glucuronidase oligosaccharides in mouse P388D1 cells*. J Biol Chem, 1981. **256(24)**: p. 13060-7.
48. Varki, A. and S. Kornfeld, *The spectrum of anionic oligosaccharides released by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H from glycoproteins. Structural studies and interactions with the phosphomannosyl receptor*. J Biol Chem, 1983. **258(5)**: p. 2808-18.

49. Varki, A. and S. Kornfeld, *Identification of a rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase capable of removing "blocking" alpha-N-acetylglucosamine residues from phosphorylated high mannose oligosaccharides of lysosomal enzymes.* J Biol Chem, 1980. **255**(18): p. 8398-401.
50. Dahms, N. and M.K. Hancock, *P-type lectins.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1572**(2-3): p. 317-40.
51. Sahagian, G.G., J. Distler, and G.W. Jourdian, *Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular beta-galactosidase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4289-93.
52. Oshima, A., et al., *The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells.* J Biol Chem, 1988. **263**(5): p. 2553-62.
53. Lobel, P., N.M. Dahms, and S. Kornfeld, *Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor.* J Biol Chem, 1988. **263**(5): p. 2563-70.
54. Westlund, B., N.M. Dahms, and S. Kornfeld, *The bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. Localization of mannose 6-phosphate binding sites to domains 1-3 and 7-11 of the extracytoplasmic region.* J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 23233-9.
55. Tong, P.Y., S.E. Tollefsen, and S. Kornfeld, *The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II.* J Biol Chem, 1988. **263**(6): p. 2585-8.
56. Morgan, D.O., et al., *Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein.* Nature, 1987. **329**(6137): p. 301-7.

57. MacDonald, R.G., et al., *A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate*. Science, 1988. **239**(4844): p. 1134-7.
58. Griffiths, G.M. and S. Isaaz, *Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor*. J Cell Biol, 1993. **120**(4): p. 885-96.
59. Motyka, B., et al., *Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis*. Cell, 2000. **103**(3): p. 491-500.
60. Pohlmann, R., et al., *Cloning of a cDNA encoding the human cation-dependent mannose 6-phosphate-specific receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(16): p. 5575-9.
61. Waheed, A., et al., *Quaternary structure of the Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: effect of ligand, pH, and receptor concentration on the equilibrium between dimeric and tetrameric receptor forms*. Biochemistry, 1990. **29**(10): p. 2449-55.
62. Waheed, A. and K. von Figura, *Rapid equilibrium between monomeric, dimeric and tetrameric forms of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor at 37 degrees C. Possible relation to the function of the receptor*. Eur J Biochem, 1990. **193**(1): p. 47-54.
63. Sahagian, G.G. and E.F. Neufeld, *Biosynthesis and turnover of the mannose 6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1983. **258**(11): p. 7121-8.

64. Byrd, J.C., et al., *Dimerization of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 18647-56.
65. Stein, M., et al., *46-kDa mannose 6-phosphate-specific receptor: biosynthesis, processing, subcellular location and topology*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1987. **368**(8): p. 937-47.
66. York, S.J., et al., *The rate of internalization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is enhanced by multivalent ligand binding*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 1164-71.
67. Marron-Terada, P.G., et al., *Recognition of Dictyostelium discoideum lysosomal enzymes is conferred by the amino-terminal carbohydrate binding site of the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor*. Biochemistry, 2000. **39**(9): p. 2243-53.
68. Tong, P.Y., W. Gregory, and S. Kornfeld, *Ligand interactions of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. The stoichiometry of mannose 6-phosphate binding*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7962-9.
69. Tong, P.Y. and S. Kornfeld, *Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor*. J Biol Chem, 1989. **264**(14): p. 7970-5.
70. Watanabe, H., J.H. Grubb, and W.S. Sly, *The overexpressed human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of beta-glucuronidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 8036-40.
71. Varki, A. and S. Kornfeld, *Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides*. J Biol Chem, 1980. **255**(22): p. 10847-58.

72. Ludwig, T., et al., *Differential sorting of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient fibroblasts*. EMBO J, 1994. **13**(15): p. 3430-7.
73. Pohlmann, R., M.W. Boeker, and K. von Figura, *The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27311-8.
74. Qian, M., et al., *Proteomics analysis of serum from mutant mice reveals lysosomal proteins selectively transported by each of the two mannose 6-phosphate receptors*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(1): p. 58-70.
75. Ghosh, P., N.M. Dahms, and S. Kornfeld, *Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(3): p. 202-12.
76. Dittmer, F., et al., *Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific*. J Cell Sci, 1999. **112 (Pt 10)**: p. 1591-7.
77. Petersen, C.M., et al., *Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3599-605.
78. Marcusson, E.G., et al., *The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene*. Cell, 1994. **77**(4): p. 579-86.
79. Lefrancois, S., et al., *The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin*. EMBO J, 2003. **22**(24): p. 6430-7.
80. Ni, X. and C.R. Morales, *The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor*. Traffic, 2006. **7**(7): p. 889-902.

81. Vaegter, C.B., et al., *Sortilin associates with Trk receptors to enhance anterograde transport and neurotrophin signaling*. Nat Neurosci, 2011. **14**(1): p. 54-61.
82. Chen, Z.Y., et al., *Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway*. J Neurosci, 2005. **25**(26): p. 6156-66.
83. Mazella, J., et al., *The 100-kDa neurotensin receptor is gp95/sortilin, a non-G-protein-coupled receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26273-6.
84. Morinville, A., et al., *Internalization and trafficking of neurotensin via NTS3 receptors in HT29 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2153-68.
85. Carlo, A.S., *Sortilin, a novel APOE receptor implicated in Alzheimer disease*. Prion, 2013. **7**(5): p. 378-82.
86. Hiesberger, T., et al., *Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)*. EMBO J, 1998. **17**(16): p. 4617-25.
87. Reczek, D., et al., *LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase*. Cell, 2007. **131**(4): p. 770-83.
88. Kolset, S.O., et al., *Serglycin-binding proteins in activated macrophages and platelets*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(4): p. 545-54.
89. Kolset, S.O. and G. Pejler, *Serglycin: a structural and functional chameleon with wide impact on immune cells*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 4927-33.
90. Lemansky, P., et al., *The cation-independent mannose 6-phosphate receptor is involved in lysosomal delivery of serglycin*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(4): p. 1149-58.

91. Coutinho, M.F., M.J. Prata, and S. Alves, *Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction*. Mol Genet Metab, 2012. **105**(4): p. 542-50.
92. Johnson, K.F. and S. Kornfeld, *The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi*. J Cell Biol, 1992. **119**(2): p. 249-57.
93. Johnson, K.F. and S. Kornfeld, *A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17110-5.
94. Nielsen, M.S., et al., *The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein*. EMBO J, 2001. **20**(9): p. 2180-90.
95. Bonifacino, J.S. and L.M. Traub, *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 395-447.
96. Puertollano, R., et al., *Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs*. Science, 2001. **292**(5522): p. 1712-6.
97. Ohno, H., et al., *Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins*. Science, 1995. **269**(5232): p. 1872-5.
98. Honing, S., et al., *The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor contains multiple binding sites for clathrin adaptors*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): p. 19884-90.

99. Ghosh, P. and S. Kornfeld, *The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1*. Arch Biochem Biophys, 2004. **426**(2): p. 225-30.
100. Bonifacino, J.S., *The GGA proteins: adaptors on the move*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(1): p. 23-32.
101. Doray, B., et al., *Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network*. Science, 2002. **297**(5587): p. 1700-3.
102. McNiven, M.A. and H.M. Thompson, *Vesicle formation at the plasma membrane and trans-Golgi network: the same but different*. Science, 2006. **313**(5793): p. 1591-4.
103. Seaman, M.N., *Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 111-22.
104. Seaman, M.N., J.M. McCaffery, and S.D. Emr, *A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast*. J Cell Biol, 1998. **142**(3): p. 665-81.
105. Seaman, M.N., et al., *Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 79-92.
106. Swarbrick, J.D., et al., *VPS29 is not an active metallo-phosphatase but is a rigid scaffold required for retromer interaction with accessory proteins*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20420.
107. Haft, C.R., et al., *Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(12): p. 4105-16.

108. Nothwehr, S.F., S.A. Ha, and P. Bruinsma, *Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 297-310.
109. Horazdovsky, B.F., et al., *A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(8): p. 1529-41.
110. Wassmer, T., et al., *A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 1): p. 45-54.
111. van Weering, J.R., et al., *Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules*. EMBO J, 2012. **31**(23): p. 4466-80.
112. Harterink, M., et al., *A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(8): p. 914-23.
113. Seaman, M.N., et al., *Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 14): p. 2371-82.
114. Rojas, R., et al., *Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7*. J Cell Biol, 2008. **183**(3): p. 513-26.
115. Seaman, M.N., *The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 20): p. 4693-702.
116. Touchot, N., P. Chardin, and A. Tavitian, *Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(23): p. 8210-4.

117. Zerial, M. and H. McBride, *Rab proteins as membrane organizers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 107-17.
118. Colicelli, J., *Human RAS superfamily proteins and related GTPases*. Sci STKE, 2004. **2004**(250): p. RE13.
119. Alexandrov, K., et al., *Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes*. EMBO J, 1994. **13**(22): p. 5262-73.
120. Soldati, T., M.A. Riederer, and S.R. Pfeffer, *Rab GDI: a solubilizing and recycling factor for rab9 protein*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(4): p. 425-34.
121. Ullrich, O., et al., *Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 18143-50.
122. Collins, R.N., *"Getting it on"--GDI displacement and small GTPase membrane recruitment*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1064-6.
123. Barr, F. and D.G. Lambright, *Rab GEFs and GAPs*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(4): p. 461-70.
124. Dumas, J.J., et al., *Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins*. Structure, 1999. **7**(4): p. 413-23.
125. Garrett, M.D., et al., *Interaction of Sec4 with GDI proteins from bovine brain, Drosophila melanogaster and Saccharomyces cerevisiae. Conservation of GDI membrane dissociation activity*. FEBS Lett, 1993. **331**(3): p. 233-8.
126. Hutagalung, A.H. and P.J. Novick, *Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 119-49.

127. Feng, Y., B. Press, and A. Wandinger-Ness, *Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 1): p. 1435-52.
128. Wichmann, H., L. Hengst, and D. Gallwitz, *Endocytosis in yeast: evidence for the involvement of a small GTP-binding protein (Ypt7p)*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1131-42.
129. Nordmann, M., et al., *The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7*. Curr Biol, 2010. **20**(18): p. 1654-9.
130. Cui, Y., et al., *Activation of the Rab7 GTPase by the MON1-CCZ1 Complex Is Essential for PVC-to-Vacuole Trafficking and Plant Growth in Arabidopsis*. Plant Cell, 2014. **26**(5): p. 2080-2097.
131. Zhang, X.M., et al., *TBC domain family, member 15 is a novel mammalian Rab GTPase-activating protein with substrate preference for Rab7*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **335**(1): p. 154-61.
132. Albert, S., E. Will, and D. Gallwitz, *Identification of the catalytic domains and their functionally critical arginine residues of two yeast GTPase-activating proteins specific for Ypt/Rab transport GTPases*. EMBO J, 1999. **18**(19): p. 5216-25.
133. Nordmann, M.U., C. Cabrera, M., *Role of Rab7/Ypt7 in organizing membrane trafficking at the late endosome*, in *Rab GTPases and membrane trafficking*, G.S. Li, N., Editor. 2012: USA. p. 132-143.
134. Cantalupo, G., et al., *Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes*. EMBO J, 2001. **20**(4): p. 683-93.
135. Pankiv, S., et al., *FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport*. J Cell Biol, 2010. **188**(2): p. 253-69.

136. Dong, J., et al., *The proteasome alpha-subunit XAPC7 interacts specifically with Rab7 and late endosomes*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21334-42.
137. Stein, M.P., et al., *Human VPS34 and p150 are Rab7 interacting partners*. Traffic, 2003. **4**(11): p. 754-71.
138. Seals, D.F., et al., *A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9402-7.
139. Nadolski, M.J. and M.E. Linder, *Protein lipidation*. FEBS J, 2007. **274**(20): p. 5202-10.
140. Zhang, F.L. and P.J. Casey, *Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 241-69.
141. Hancock, J.F., et al., *All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated*. Cell, 1989. **57**(7): p. 1167-77.
142. Gibbs, J.B., *Ras C-terminal processing enzymes--new drug targets?* Cell, 1991. **65**(1): p. 1-4.
143. Kinsella, B.T. and W.A. Maltese, *rab GTP-binding proteins implicated in vesicular transport are isoprenylated in vitro at cysteines within a novel carboxyl-terminal motif*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8540-4.
144. Shen, M., et al., *Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I: structures, mechanism, inhibitors and molecular modeling*. Drug Discov Today, 2014.
145. Gutkowska, M. and E. Swiezewska, *Structure, regulation and cellular functions of Rab geranylgeranyl transferase and its cellular partner Rab Escort Protein*. Mol Membr Biol, 2012. **29**(7): p. 243-56.

146. Seabra, M.C., et al., *Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14497-503.
147. Seabra, M.C., et al., *Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product*. Cell, 1992. **70**(6): p. 1049-57.
148. Andres, D.A., et al., *cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1091-9.
149. Hancock, J.F., K. Cadwallader, and C.J. Marshall, *Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B)*. EMBO J, 1991. **10**(3): p. 641-6.
150. Hancock, J.F., H. Paterson, and C.J. Marshall, *A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane*. Cell, 1990. **63**(1): p. 133-9.
151. Mann, R.K. and P.A. Beachy, *Novel lipid modifications of secreted protein signals*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 891-923.
152. Kohtz, J.D., et al., *N-terminal fatty-acylation of sonic hedgehog enhances the induction of rodent ventral forebrain neurons*. Development, 2001. **128**(12): p. 2351-63.
153. Taylor, F.R., et al., *Enhanced potency of human Sonic hedgehog by hydrophobic modification*. Biochemistry, 2001. **40**(14): p. 4359-71.
154. Buglino, J.A. and M.D. Resh, *Hhat is a palmitoylacyltransferase with specificity for N-palmitoylation of Sonic Hedgehog*. J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 22076-88.

155. Chen, M.H., et al., *Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates*. *Genes Dev*, 2004. **18**(6): p. 641-59.
156. McCormick, P.J., et al., *Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking*. *Traffic*, 2008. **9**(11): p. 1984-97.
157. Mor, A. and M.R. Philips, *Compartmentalized Ras/MAPK signaling*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 771-800.
158. Mitchell, D.A., et al., *A polybasic domain allows nonprenylated Ras proteins to function in Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(34): p. 21540-6.
159. Bartels, D.J., et al., *Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(10): p. 6775-87.
160. Zhao, L., et al., *Erf4p and Erf2p form an endoplasmic reticulum-associated complex involved in the plasma membrane localization of yeast Ras proteins*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(51): p. 49352-9.
161. Fukata, M., et al., *Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes*. *Neuron*, 2004. **44**(6): p. 987-96.
162. Mitchell, D.A., et al., *Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(6): p. 1118-27.
163. Greaves, J. and L.H. Chamberlain, *DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho)physiology*. *Trends Biochem Sci*, 2011. **36**(5): p. 245-53.
164. Smotrys, J.E. and M.E. Linder, *Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 559-87.

165. Camp, L.A., et al., *Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 23212-9.
166. Verkruyse, L.A. and S.L. Hofmann, *Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15831-6.
167. Vesa, J., et al., *Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis*. Nature, 1995. **376**(6541): p. 584-7.
168. Duncan, J.A. and A.G. Gilman, *A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS)*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15830-7.
169. Fuller, M., P.J. Meikle, and J.J. Hopwood, *Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview*, in *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, A. Mehta, M. Beck, and G. Sunder-Plassmann, Editors. 2006: Oxford.
170. Vitner, E.B., F.M. Platt, and A.H. Futerman, *Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases*. J Biol Chem, 2010. **285**(27): p. 20423-7.
171. Futerman, A.H. and G. van Meer, *The cell biology of lysosomal storage disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(7): p. 554-65.
172. Tay, W., *Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant*. Trans Ophthalmol Soc., 1881. **1**: p. 55-57.
173. Sachs, B., *On arrested cerebral development with special reference to cortical pathology*. J. Nerv. Ment. Dis, 1887. **14**: p. 541-554.
174. Jeyakumar, M., et al., *Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis*. Brain, 2003. **126**(Pt 4): p. 974-87.

175. Dvir, H., et al., *X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease*. EMBO Rep, 2003. **4**(7): p. 704-9.
176. Weinreb, N.J., et al., *Life expectancy in Gaucher disease type I*. Am J Hematol, 2008. **83**(12): p. 896-900.
177. Hopwood, J.J. and A. Ballabio, *Multiple sulfatase deficiency and the nature of the sulfatase family*, in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, C.R. Scriver, et al., Editors. 2001, Mcgraw-Hill: New York. p. 3725-32.
178. Carlson, B.L., et al., *Function and structure of a prokaryotic formylglycine-generating enzyme*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20117-25.
179. Parenti, G., G. Meroni, and A. Ballabio, *The sulfatase gene family*. Curr Opin Genet Dev, 1997. **7**(3): p. 386-91.
180. Cosma, M.P., et al., *The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases*. Cell, 2003. **113**(4): p. 445-56.
181. Saftig, P., B. Schroder, and J. Blanz, *Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(6): p. 1420-3.
182. Saftig, P., et al., *Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease*. Trends Mol Med, 2001. **7**(1): p. 37-9.
183. Carstea, E.D., et al., *Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis*. Science, 1997. **277**(5323): p. 228-31.
184. Pentchev, P.G., et al., *A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(23): p. 8247-51.

185. Sokol, J., et al., *Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol*. J Biol Chem, 1988. **263**(7): p. 3411-7.
186. Conzelmann, E. and K. Sandhoff, *AB variant of infantile GM2 gangliosidosis: deficiency of a factor necessary for stimulation of hexosaminidase A-catalyzed degradation of ganglioside GM2 and glycolipid GA2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(8): p. 3979-83.
187. Mahuran, D.J., *Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidosis*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1455**(2-3): p. 105-38.
188. Jeyakumar, M., et al., *Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(9): p. 713-25.
189. Jalanko, A. and T. Braulke, *Neuronal ceroid lipofuscinoses*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(4): p. 697-709.
190. Hellsten, E., et al., *From locus to cellular disturbances: positional cloning of the infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene*. Neuropediatrics, 1997. **28**(1): p. 9-11.
191. Simonati, A., et al., *Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: The Increasing Spectrum of an Old Disease*. Curr Mol Med, 2014.
192. Haltia, M., *The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(10): p. 850-6.
193. Williams, R.E. and S.E. Mole, *New nomenclature and classification scheme for the neuronal ceroid lipofuscinoses*. Neurology, 2012. **79**(2): p. 183-91.
194. Arsov, T., et al., *Kufs disease, the major adult form of neuronal ceroid lipofuscinosis, caused by mutations in CLN6*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(5): p. 566-73.

195. Heine, C., et al., *Defective endoplasmic reticulum-resident membrane protein CLN6 affects lysosomal degradation of endocytosed arylsulfatase A*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22347-52.
196. *Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The International Batten Disease Consortium*. Cell, 1995. **82**(6): p. 949-57.
197. Williams, R.E., et al., *Diagnosis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: an update*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(10): p. 865-72.
198. Ezaki, J., et al., *Characterization of Cln3p, the gene product responsible for juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis, as a lysosomal integral membrane glycoprotein*. J Neurochem, 2003. **87**(5): p. 1296-308.
199. Nugent, T., S.E. Mole, and D.T. Jones, *The transmembrane topology of Batten disease protein CLN3 determined by consensus computational prediction constrained by experimental data*. FEBS Lett, 2008. **582**(7): p. 1019-24.
200. Kytölä, A., et al., *Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1313-23.
201. Storch, S., et al., *C-terminal prenylation of the CLN3 membrane glycoprotein is required for efficient endosomal sorting to lysosomes*. Traffic, 2007. **8**(4): p. 431-44.
202. Pearce, D.A. and F. Sherman, *A yeast model for the study of Batten disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6915-8.
203. Gachet, Y., et al., *btn1, the Schizosaccharomyces pombe homologue of the human Batten disease gene CLN3, regulates vacuole homeostasis*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5525-36.

204. Santavuori, P., *Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood*. Brain Dev, 1988. **10**(2): p. 80-3.
205. Mitchison, H.M., et al., *Mutations in the palmitoyl-protein thioesterase gene (PPT; CLN1) causing juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis with granular osmiophilic deposits*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(2): p. 291-7.
206. Ahtiainen, L., et al., *Palmitoyl protein thioesterase 1 (PPT1) deficiency causes endocytic defects connected to abnormal saposin processing*. Exp Cell Res, 2006. **312**(9): p. 1540-53.
207. Sleat, D.E., et al., *Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis*. Science, 1997. **277**(5333): p. 1802-5.
208. Golabek, A.A. and E. Kida, *Tripeptidyl-peptidase I in health and disease*. Biol Chem, 2006. **387**(8): p. 1091-9.
209. Junaid, M.A. and R.K. Pullarkat, *Increased brain lysosomal pepstatin-insensitive proteinase activity in patients with neurodegenerative diseases*. Neurosci Lett, 1999. **264**(1-3): p. 157-60.
210. Savukoski, M., et al., *CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 286-8.
211. Vesa, J., et al., *Neuronal ceroid lipofuscinoses are connected at molecular level: interaction of CLN5 protein with CLN2 and CLN3*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(7): p. 2410-20.
212. Kytölä, A., et al., *Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(10): p. 920-33.

213. Bessa, C., et al., *Two novel CLN5 mutations in a Portuguese patient with vLINCL: insights into molecular mechanisms of CLN5 deficiency*. Mol Genet Metab, 2006. **89**(3): p. 245-53.
214. Santavuori, P., et al., *The spectrum of Jansky-Bielschowsky disease*. Neuropediatrics, 1991. **22**(2): p. 92-6.
215. Santavuori, P., et al., *A variant of Jansky-Bielschowsky disease*. Neuropediatrics, 1982. **13**(3): p. 135-41.
216. Holmberg, V., et al., *Phenotype-genotype correlation in eight patients with Finnish variant late infantile NCL (CLN5)*. Neurology, 2000. **55**(4): p. 579-81.
217. Hobbs, J.R., et al., *Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation*. Lancet, 1981. **2**(8249): p. 709-12.
218. Malatack, J.J., D.M. Consolini, and E. Bayever, *The status of hematopoietic stem cell transplantation in lysosomal storage disease*. Pediatr Neurol, 2003. **29**(5): p. 391-403.
219. Weinreb, N.J., *Imiglucerase and its use for the treatment of Gaucher's disease*. Expert Opin Pharmacother, 2008. **9**(11): p. 1987-2000.
220. Brady, R.O., *Enzyme replacement for lysosomal diseases*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 283-96.
221. Cox, T., et al., *Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1481-5.
222. Lonser, R.R., et al., *Convection perfusion of glucocerebrosidase for neuronopathic Gaucher's disease*. Ann Neurol, 2005. **57**(4): p. 542-8.

223. Vikis, H.G. and K.L. Guan, *Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 175-86.
224. Terman, A. and U.T. Brunk, *Ceroid/lipofuscin formation in cultured human fibroblasts: the role of oxidative stress and lysosomal proteolysis*. Mech Ageing Dev, 1998. **104**(3): p. 277-91.
225. Terman, A. and U.T. Brunk, *On the degradability and exocytosis of ceroid/lipofuscin in cultured rat cardiac myocytes*. Mech Ageing Dev, 1998. **100**(2): p. 145-56.
226. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
227. Schmiedt, M.L., et al., *The neuronal ceroid lipofuscinosis protein CLN5: new insights into cellular maturation, transport, and consequences of mutations*. Hum Mutat, 2010. **31**(3): p. 356-65.
228. Arighi, C.N., et al., *Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor*. J Cell Biol, 2004. **165**(1): p. 123-33.
229. Rink, J., et al., *Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes*. Cell, 2005. **122**(5): p. 735-49.
230. Wang, T., K.K. Wong, and W. Hong, *A unique region of RILP distinguishes it from its related proteins in its regulation of lysosomal morphology and interaction with Rab7 and Rab34*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 815-26.
231. Rojas, R., et al., *Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(3): p. 1112-24.

232. Isosomppi, J., et al., *Lysosomal localization of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 protein*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(8): p. 885-91.
233. Lorenz, H., et al., *The fluorescence protease protection (FPP) assay to determine protein localization and membrane topology*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 276-9.
234. Dou, D., et al., *Type II transmembrane domain hydrophobicity dictates the cotranslational dependence for inversion*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(21): p. 3363-74.
235. Holmberg, V., et al., *The mouse ortholog of the neuronal ceroid lipofuscinosis CLN5 gene encodes a soluble lysosomal glycoprotein expressed in the developing brain*. Neurobiol Dis, 2004. **16**(1): p. 29-40.
236. Larkin, H., M.G. Ribeiro, and C. Lavoie, *Topology and membrane anchoring of the lysosomal storage disease-related protein CLN5*. Hum Mutat, 2013. **34**(12): p. 1688-97.
237. Weihofen, A., et al., *Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease*. Science, 2002. **296**(5576): p. 2215-8.
238. Ponting, C.P., et al., *Identification of a novel family of presenilin homologues*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 1037-44.
239. Grigorenko, A.P., et al., *Novel class of polytopic proteins with domains associated with putative protease activity*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(7): p. 826-35.
240. Voss, M., B. Schroder, and R. Fluhrer, *Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1828**(12): p. 2828-39.

241. Fluhrer, R., H. Steiner, and C. Haass, *Intramembrane proteolysis by signal peptide peptidases: a comparative discussion of GXGD-type aspartyl proteases*. J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 13975-9.
242. Krawitz, P., et al., *Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39515-23.
243. Friedmann, E., et al., *SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 843-8.
244. Voss, M., et al., *Foamy virus envelope protein is a substrate for signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3)*. J Biol Chem, 2012. **287**(52): p. 43401-9.
245. Getty, A.L. and D.A. Pearce, *Interactions of the proteins of neuronal ceroid lipofuscinosis: clues to function*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(3): p. 453-74.
246. Lyly, A., et al., *Novel interactions of CLN5 support molecular networking between Neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins*. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 83.
247. Kollmann, K., et al., *Cell biology and function of neuronal ceroid lipofuscinosis-related proteins*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(11): p. 1866-81.
248. Winter, E. and C.P. Ponting, *TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains?* Trends Biochem Sci, 2002. **27**(8): p. 381-3.
249. Fossale, E., et al., *Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis*. BMC Neurosci, 2004. **5**: p. 57.

250. Codlin, S. and S.E. Mole, *S. pombe btn1, the orthologue of the Batten disease gene CLN3, is required for vacuole protein sorting of Cpy1p and Golgi exit of Vps10p*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 8): p. 1163-73.
251. Metcalf, D.J., et al., *Loss of the Batten disease gene CLN3 prevents exit from the TGN of the mannose 6-phosphate receptor*. Traffic, 2008. **9**(11): p. 1905-14.
252. Uusi-Rauva, K., et al., *Neuronal ceroid lipofuscinosis protein CLN3 interacts with motor proteins and modifies location of late endosomal compartments*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(12): p. 2075-89.
253. Munday, A.D. and J.A. Lopez, *Posttranslational protein palmitoylation: promoting platelet purpose*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(7): p. 1496-9.
254. Brown, D.A. and E. London, *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17221-4.
255. Edidin, M., *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 257-83.
256. Mayor, S., S. Sabharanjak, and F.R. Maxfield, *Cholesterol-dependent retention of GPI-anchored proteins in endosomes*. EMBO J, 1998. **17**(16): p. 4626-38.
257. Molenaar, C.M., R. Prange, and D. Gallwitz, *A carboxyl-terminal cysteine residue is required for palmitic acid binding and biological activity of the ras-related yeast YPT1 protein*. EMBO J, 1988. **7**(4): p. 971-6.
258. Newman, C.M., et al., *Post-translational processing of Schizosaccharomyces pombe YPT proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11329-36.
259. Hannoush, R.N. and J. Sun, *The chemical toolbox for monitoring protein fatty acylation and prenylation*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(7): p. 498-506.

260. Balderhaar, H.J., et al., *The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 23): p. 4085-94.
261. Kao, L.R., et al., *Interactions between the ankyrin repeat-containing protein Akr1p and the pheromone response pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(1): p. 168-78.
262. Feng, Y. and N.G. Davis, *Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(14): p. 5350-9.
263. Ohno, Y., et al., *Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(4): p. 474-83.
264. Dighe, S.A. and K.G. Kozminski, *Swf1p, a member of the DHHC-CRD family of palmitoyltransferases, regulates the actin cytoskeleton and polarized secretion independently of its DHHC motif*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4454-68.
265. Valdez-Taubas, J. and H. Pelham, *Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation*. EMBO J, 2005. **24**(14): p. 2524-32.
266. Smotrýs, J.E., et al., *The vacuolar DHHC-CRD protein Pfa3p is a protein acyltransferase for Vac8p*. J Cell Biol, 2005. **170**(7): p. 1091-9.
267. Detter, J.C., et al., *Rab geranylgeranyl transferase alpha mutation in the gunmetal mouse reduces Rab prenylation and platelet synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4144-9.

Annexes

Annexe 1 : Article

Publié dans : Biochem Biophys Res Commun. 2013 Mars 29; 433(1) :90-5.

“Sortilin turnover is mediated by ubiquitination”

Karine Dumaresq-Doiron^a, Felix Jules^{a, b}, Stephane Lefrancois^{a, c}

^a Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H1T 2M4

^b Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada H3T 1J4

^c Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada H3T 3J7

A1.1 Abstract

Sortilin is a transmembrane domain protein that has been implicated in the sorting of prosaposin and other soluble cargo from the Golgi to the lysosomal compartment. While the majority of the receptor is recycled back to the Golgi from endosomes, it is known that upon successive rounds of transport, a proportion of sortilin is degraded in lysosomes. Recently, it was shown that sortilin is palmitoylated and that this post-translational modification prevents its degradation and enables sortilin to efficiently traffic back to the Golgi. Thus palmitoylation can be used to modulate the amount of receptor and hence cargo reaching the lysosome. In this work, we demonstrate that non-palmitoylated sortilin is ubiquitinated and internalized into the lysosomal compartment via the ESCRT pathway for degradation. Furthermore, we identified Nedd4 as an E3 ubiquitin ligase that mediates this post-translational modification. We propose a model where palmitoylation and ubiquitination play opposite roles in the stability and turnover of sortilin and serve as a control mechanism that balances the amount of lysosomal sorting and trafficking in cells.

A1.2 Introduction

Sortilin is a member of the Vps10p family of sorting receptors [1] and cycles mainly between the Golgi apparatus and endosomes where it functions as a lysosomal sorting receptor [2]. It has been shown to traffic soluble lysosomal cargo such as prosaposin, GM2-activator protein and acid sphingomyelinase [2] and [3]. A small proportion of sortilin also localizes to the plasma membrane where it interacts with and internalizes lipoprotein lipase for lysosomal degradation [4]. In order to exit the Golgi, sortilin is packaged into clathrin coated vesicles by cytosolic factors such as adaptor protein-1 (AP1) [5] and the Golgi-localized, gamma-ear-containing Arf-binding proteins (GGAs) [6]. When these trafficking vesicles reach the endosomes, cargo dissociates from the receptor due to the more acidic pH in this organelle [7], which is then able to reach the lysosomes while, the majority of the receptor is recycled back to the Golgi for another round of cargo binding and trafficking [8]. The efficient endosome-to-Golgi sorting and trafficking of sortilin is mediated by retromer [5], a heteropentameric complex first discovered in yeast where it was shown to have a role in the endosome-to-Golgi trafficking of Vacuolar Sorting Protein 10 (Vps10p), the yeast homologue of mammalian sortilin [9]. In mammalian cells, retromer is divided in two subcomplexes: the Vps26, Vps29 and Vps35 trimer implicated in cargo recognition [9] along with a combination of two sorting nexins (SNX1, SNX2, SNX5 and SNX6) responsible for membrane binding [8]. Both subcomplexes are required for the efficient endosome-to-Golgi trafficking of sortilin [10], [11] and [12].

We have previously shown that sortilin is palmitoylated on its cytosolic tail at cysteine 783, and that this post-translational modification is required for its efficient endosome-to-Golgi trafficking [13]. Palmitoylation is a reversible post-translational modification which consists in the linkage of a 16-carbon chain of saturated palmitic acid on a cysteine residue [14]. Additionally, we identified DHHC15, a member of the recently discovered palmitoyltransferases that share a common catalytic domain composed of an aspartic acid, histidine, histidine and cysteine (DHHC) motif [15], as the palmitoyltransferase required to palmitoylate sortilin [13]. Functionally, we demonstrated that non-palmitoylated sortilin, either by mutating the site of palmitoylation or by depleting cells of DHHC15, was not recycled back to the Golgi and was rapidly degraded in lysosomes [13]. The palmitoylation of sortilin appears to provide an opportunity to control the amount of receptor available for sorting and trafficking and the amount of cargo that reaches the lysosomes.

In this work, we found that sortilin, when not palmitoylated, is monoubiquitinated and degraded in the lysosomal compartment. We also demonstrate that the ESCRT complex is required for the degradation of non-palmitoylated, ubiquitinated sortilin and that Nedd4 plays an important role in this process. We propose a model whereby palmitoylation and ubiquitination control the amount of intracellular sortilin and provide cells the opportunity to control lysosomal sorting and trafficking.

A1.3 Materials and methods

Antibodies, cDNA constructs and siRNA

Unless otherwise noted, all reagents were purchased from Sigma–Aldrich (Oakville, ON). The following mouse monoclonal antibodies were used: anti-myc (MMS-150P) and anti-HA (MMS-101P) (Covance, Emeryville, CA), anti-TSG101 (ab83, Abcam, Cambridge, MA), anti-ubiquitin (550944), anti-Actin Ab-5 (612657) and anti-Nedd4 (611481) (BD Biosciences, Mississauga, ON). The HA-Nedd4 (Plasmid 11426) was purchased from Addgene (Cambridge, MA). HA-c-Cbl was a generous gift from Dr. Hamid Band (Brigham and Women’s Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA). The sortilin-myc and sortilinC783S-myc were previously described [13]. To generate sortilinC783S,K818R-myc, site directed mutagenesis was performed as previously described [13]. RNAi against TSG101 (TSG101HSS111013, TSG101HSS111014, TSG101HSS111015) and against Nedd4 (NEDD4HSS107062, NEDD4HSS107063, NEDD4HSS107064) were purchased from Life Technologies (Burlington, ON).

Cell culture

All cell culture reagents were purchased from Life Technologies (Burlington, ON). Cells were grown in DMEM (11995) supplemented with 10% FBS (12483) and penicillin–streptomycin (15,140). Transfections were performed using Lipofectamine Transfection Reagent (18324) and Plus Reagent (11514) in 10 cm² plates according to manufacturer’s instructions. BD Biosciences, Mississauga, ON). RNA interference was performed using

Oligofectamine Transfection Reagent (12252011) using 100 nM of RNAi on 2 consecutive days. Assays were subsequently performed 48 h after the second RNAi treatment.

Whole cell lysate preparation

Cells were lysed in cell lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail) for 30 min on ice and centrifuged at 3300 rcf for 15 min at 4 °C to remove debris.

Cycloheximide chase

Cells were incubated with or without 50 µg/ml of cycloheximide (C7698) for 6 h prior to cell lysis (described above).

Co-immunoprecipitation

Cell lysates were incubated overnight at 4 °C with 3 µg of mono-HA or 2.1 µg of mono-myc antibody followed by a one-hour incubation at 4 °C with protein G-Sepharose beads (17-0618-01, GE Healthcare, Baie-d'Urfé, QC). The samples were centrifuged to remove the supernatant and the beads were washed 3 times for 5 min with ice-cold lysis buffer. Laemmli sample buffer was added to the beads and samples were analysed by immunoblotting as described above.

A1.4 Results and discussion

Non-palmitoylated sortilin is ubiquitinated on lysine 818

As we have previously demonstrated that sortilin is degraded in lysosomes when it is not palmitoylated [13], we tested if this degradation is mediated by ubiquitination, as transmembrane domain proteins are known to be monoubiquitinated prior to lysosomal degradation, whereas polyubiquitination usually results in proteasomal degradation [16]. Ubiquitination, is a reversible enzyme-mediated post-translational modification that adds a ubiquitin (Ub) polypeptide to lysine residues on target proteins [17] which serves as a degradation signal for transmembrane domain proteins. To test if non-palmitoylated sortilin is ubiquitinated, we transfected HeLa cells with wild-type sortilin-myc which was then purified from whole cell lysates by immunoprecipitation. Immunoprecipitated proteins were migrated on a 12% gel and the ubiquitination status of wild-type sortilin was assessed by staining with an anti-ubiquitin antibody (Fig. A1.1A). We were able to detect a weak signal for ubiquitin (Fig. A1.1A, lane 2) which suggested that a very small proportion of sortilin is ubiquitinated and this population probably corresponds to the fraction destined for lysosomal degradation which occurs during successive rounds of trafficking. To ensure that the anti-ubiquitin antibody could efficiently recognize ubiquitin, we ran a total cell lysate and performed a Western blot. We found the characteristic ubiquitin “smear” suggesting that this antibody did in fact recognize ubiquitin (Fig. A1.1A, lane 1). Next, we tested the hypothesis that the fraction of ubiquitinated wild-type receptor was not palmitoylated. To test this, we transfected HeLa cells with sortilinC783S-myc, a mutant form of sortilin that cannot be palmitoylated

[13], and repeated the immunoprecipitation assay (Fig. A1.1A). In this experiment, the amount of ubiquitinated sortilin was notably increased (Fig. A1.1A, lane 3) compared to wild-type sortilin-myc. Our results suggest that when sortilin is not palmitoylated, it is modified by ubiquitin and subsequently degraded in lysosomes. The interplay between palmitoylation and ubiquitination provides cells the ability to control the amount of sortilin and therefore the amount of lysosomal cargo that reaches the lysosomes. Since the site of palmitoylation is in the cytosolic tail of sortilin (Fig. A1.1B, Box 1), we rationalized that the site of ubiquitination could also be in this region. Using bioinformatics, we identified a lysine at position 818 (Fig. A1.1B, Box 2) in the cytosolic tail of sortilin that we mutated to arginine to determine if sortilin could still be ubiquitinated. To determine if lysine 818 is the site of ubiquitination of sortilin, we immunoprecipitated sortilinC783S-myc or sortilinC783S,K818R-myc from whole cell lysates and Western blotted for ubiquitin. We found that non-palmitoylated receptor (sortilinC783S) is ubiquitinated (Fig. A1.1C) while non-palmitoylated receptor with the lysine mutation (sortilinC783S,K818R) is no longer modified by ubiquitin (Fig. A1.1C). This confirmed our hypothesis that sortilin, when not palmitoylated, is ubiquitinated and that the site of ubiquitination is in its cytosolic tail at lysine 818. The fact that we observe one band, as opposed to a smear in these Western blots, suggests that sortilin is monoubiquitinated, which is consistent with the mechanism of degradation of transmembrane domain proteins in lysosomes [18]. Our results so far support our hypothesis that palmitoylation prevents ubiquitination of sortilin and enables its recycling back to the Golgi apparatus. When cells need to degrade sortilin, they could block the palmitoylation of the receptor by inhibiting the function of DHHC15, previously identified as the sortilin palmitoyltransferase [13], which would then be ubiquitinated on lysine 818 and degraded in lysosomes.

Non-palmitoylated sortilin is degraded through the ESCRT pathway

Transmembrane domain monoubiquitinated proteins interact with the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) machinery, which is involved in sequestering cargo destined for lysosomal degradation [18]. There are five distinct ESCRT complexes (ESCRT-0, -I, -II, -III and Vps4) that act sequentially to internalize cargo into multivesicular bodies for eventual degradation in lysosomes [19]. To determine if the ESCRT machinery is involved in the degradation of non-palmitoylated ubiquitinated sortilin, we depleted HeLa cells of TSG101, one of the subunits of the ESCRT-I complex [18], using siRNA and performed a cycloheximide chase experiment, to determine the degradation of sortilinC783S-myc by inhibiting de novo protein synthesis. Since previous reports had shown significant degradation of non-palmitoylated sortilin after 6 h when palmitoylation was inhibited [13], the kinetics of which is similar to the rate of degradation in retromer-depleted cells [10] and [11], we compared the levels of sortilinC783S-myc at 0 h and after a 6 h incubation with cycloheximide. We were able to efficiently deplete cells of TSG101 as shown by Western blotting (Fig. A1.2A, middle panel). As expected, we found notable degradation of sortilinC783S-myc in mock-depleted cells (Fig. A1.2A, top panel) with only 45% of the receptor remaining after 6 h (Fig. A1.2B, white bar). However, in TSG101-depleted cells, the degradation was not as significant as more than 70% of the receptor was remaining after a 6 h incubation with cycloheximide (Fig. A1.2B, white bar). Our results show that non-palmitoylated sortilin is stabilised in TSG101-depleted HeLa cells suggesting that degradation of ubiquitinated sortilin normally occurs through the ESCRT pathway. Although the ubiquitin and ESCRT machinery are well characterized in the degradation of transmembrane proteins originating from the plasma membrane, the relatively short time frame and taking into

consideration that 90% of sortilin cycles between the Golgi and endosomes, our interpretation of this data is that the majority of the non-palmitoylated sortilin being degraded originated from the Golgi and not the plasma membrane. To our knowledge, this is the first demonstration of a transmembrane protein originating from the Golgi using this degradation machinery in mammalian cells. Interestingly, it was very recently reported that in plant cells, a ubiquitinated reporter protein exiting the Golgi also used ubiquitination and the ESCRT degradation machinery [20]. Based on that study and our own work, we propose a novel mechanism of degradation using the ubiquitin/ESCRT pathway for proteins originating from the Golgi as well as the plasma membrane.

The E3 ligase Nedd4 participates in the degradation of non-palmitoylated sortilin

Since we found that non-palmitoylated sortilin was ubiquitinated and degraded in lysosomes, we next wanted to identify the E3 ligase responsible for the ubiquitination of non-palmitoylated sortilin. Ubiquitination is a 3 step process where an Ub-E1 activating enzyme activates Ub which is then transferred to the active site of a Ub-E2 conjugating enzyme and finally, a Ub-E3 ligase, which determines the specificity of the reaction, transfers the Ub moiety onto the target protein. At least 3 different Ub E3 ligases (AIP4, Nedd4 and c-Cbl) localize to the endosomes and act on transmembrane proteins destined for lysosomal degradation. In mammalian cells, Nedd4 has been implicated in the lysosomal trafficking of SIMPLE [21] and LAPTM5 [22] while c-Cbl has been implicated in the lysosomal degradation of the Epidermal Growth Factor receptor [23] and gp130 [19].

We tested for an interaction between sortilin and sortilinC783S with two different E3 ligases known to localize to endosomes, Nedd4 and c-Cbl using co-immunoprecipitation. We found no significant interaction between wild-type sortilin-myc and either HA-Nedd4 or HA-c-Cbl, but our results show an interaction between HA-Nedd4 (Fig. A1.3A) and sortilinC783S-myc. We did not observe an interaction between HA-c-Cbl and sortilinC783S-myc (Fig. A1.3A). This suggested that Nedd4 is a potential E3 ligase responsible for the ubiquitination of non-palmitoylated sortilin. It was not surprising that we did not observe an interaction between an E3 ligase and wild-type sortilin. Although a small proportion of sortilin is ubiquitinated (our data, Fig. A1.1) and degraded in each successive round of trafficking, the amount is very small and could be under the detection limit of our co-immunoprecipitation protocol.

Nedd4 overexpression increases sortilin degradation

Since the ubiquitination of sortilin leads to its degradation and we found an interaction between sortilinC783S-myc and HA-Nedd4, we tested whether or not the overexpression of HA-Nedd4 in HeLa cells would increase the degradation of sortilinC783S-myc. Compared to cells transfected with only sortilinC783S-myc (Fig. A1.3B), the degradation of non-palmitoylated sortilin is more important after a 6 h cycloheximide chase in HeLa cells also overexpressing HA-Nedd4 (Fig. A1.3B) as only 20% of sortilinC783S-myc remained in cells overexpressing HA-Nedd4 compared to 40% in cells not transfected with HA-Nedd4 (Fig. A1.3C). Although we observed a notable difference in the amount of sortilinC783S-myc remaining after a 6 h cycloheximide chase in the presence of HA-Nedd4, our assay is probably

underestimating the degradation of non-palmitoylated receptor as HA-Nedd4 is also being degraded (Fig. A1.3B, middle panel), which is consistent with its half life of 6 h [24]. To verify the results we found by overexpressing Nedd4, we performed the cycloheximide chase experiment in cells depleted of Nedd4 by siRNA. We were able to efficiently deplete more than 80% of Nedd4 from HeLa cells (Fig. A1.4A). Compared to mock-depleted cells, the degradation of sortilinC783S-myc in Nedd4-depleted cells was not as great (Fig. A1.4A) as we found more than 65% of sortilinC783S-myc remaining compared to 40% in mock-depleted cells (Fig. A1.4B). Based on our overexpression and siRNA experiments, our data supports a model whereby the E3 ubiquitin ligase Nedd4 would ubiquitinate non-palmitoylated sortilin resulting in its internalization into multivesicular bodies for lysosomal degradation. We did attempt to verify if overexpression of HA-Nedd4 or siRNA of Nedd4 would either increase or decrease the ubiquitination of sortilinC783S-myc. However, we could not detect a significant change in the ubiquitin signal probably due to the fact that the amount of sortilinC783S-myc we found ubiquitinated is already near saturation in the overexpression experiments and due to the remaining Nedd4 not depleted in by siRNA, a phenotype typical when trying to ascertain the function of an enzyme by siRNA. An *in vitro* system could be used to test definitively if Nedd4 can ubiquitinate non-palmitoylated sortilin, but we would need to use Escherichiacoli produced proteins which would be difficult as Nedd4 is a large protein (1319 amino acids) and sortilin is a transmembrane domain protein. We could use only the cytosolic tail of sortilin, but it is unclear whether or not Nedd4 would recognize this short peptide even if we could produce enough bacterially expressed Nedd4 to attempt the *in vitro* experiment.

The ubiquitin ligase activity of Nedd4 is required to degrade non-palmitoylated sortilin

Although we were not successful in determining whether or not Nedd4 ubiquitinates non-palmitoylated sortilin, we tested the effect of overexpressing catalytically inactive Nedd4 which does not have the ability to ubiquitinate target proteins to further characterise the role of Nedd4 in the degradation of non-palmitoylated sortilin [25]. We performed a 6 h cycloheximide chase to test the stability of sortilinC783S in cells transfected or not with HA-Nedd4C744E. Our results show that in HeLa cells overexpressing HA-Nedd4C744E, the absolute amounts of sortilinC783S-myc is greatly increased compared to HeLa cells only expressing sortilinC783S-myc (Fig. A1.4C). In fact, we found that the level of expression of sortilinC783S-myc in cells overexpressing inactive Nedd4 is up to 160% at time 0 h (Fig. A1.4D). However, the level goes down to 80% after the cycloheximide incubation compared to cells not overexpressing Nedd4C744E, where we see 40% of remaining sortilinC783S after the cycloheximide incubation (Fig. A1.4D). Although the level of expression of sortilinC783S-myc is increased in cell also overexpressing inactive Nedd4, the degradation rate seems similar in both conditions. This could be explained by the fact that the cells overexpressing inactive HA tagged Nedd4 still express endogenous levels of wild-type Nedd4. Interestingly, like wild-type HA-Nedd4, HA-Nedd4C744E is also partially degraded in the cycloheximide chase experiment after 6 h (Fig. A1.4C, middle panel). It is possible that due to this decrease in expression, endogenous Nedd4 can ubiquitinate sortilinC783S-myc resulting in its lysosomal degradation. Regardless, our data suggests that the ubiquitin ligase activity is required for the degradation of non-palmitoylated sortilin in lysosomes.

Taken together, our results show that ubiquitination, along with palmitoylation, play key roles in regulating the amount of intracellular sortilin cycling between the Golgi and endosomes. Although cells could downregulate the synthesis of sortilin to control the intracellular amount, this would be long and time consuming and could be a mechanism for cells in the long term. However, for cells to respond more quickly for the need to downregulate intracellular levels of sortilin, we propose a model whereby cells could modulate and/or block the palmitoylation of sortilin by inhibiting the action of DHHC15, previously shown to palmitoylate sortilin [13]. This would lead to the degradation of sortilin (now non-palmitoylated) in the lysosomes due to ubiquitination by Nedd4 and an interaction with the ESCRT machinery.

A1.5 Acknowledgements

The authors would like to thank Peter J. McCormick (University of Barcelona) and Santiago Costantino (Centre de recherche de l'Hopital Maisonneuve-Rosemont) for critical reading of the manuscript and helpful discussions. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grant (MOP-102754) to Stephane Lefrancois. Stephane Lefrancois is a recipient of a salary award from Fonds de recherche du Quebec – Santé. Felix Jules is supported by an Alzheimer's Society of Canada doctoral scholarship.

A1.6 References

- [1] C.M. Petersen, M.S. Nielsen, A. Nykjaer, L. Jacobsen, N. Tommerup, H.H. Rasmussen, H. Roigaard, J. Gliemann, P. Madsen, S.K. Moestrup, Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3599–3605.
- [2] S. Lefrancois, J. Zeng, A.J. Hassan, M. Canuel, C.R. Morales, The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin, *EMBO J.* 22 (2003) 6430–6437.
- [3] X. Ni, C.R. Morales, The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor, *Traffic* 7 (2006) 889–902.
- [4] M.S. Nielsen, C. Jacobsen, G. Olivecrona, J. Gliemann, C.M. Petersen, Sortilin/neurotensin receptor-3 binds and mediates degradation of lipoprotein lipase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8832–8836.
- [5] M. Canuel, S. Lefrancois, J. Zeng, C.R. Morales, AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366 (2008) 724–730.
- [6] R. Puertollano, R.C. Aguilar, I. Gorshkova, R.J. Crouch, J.S. Bonifacino, Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs, *Science* 292 (2001) 1712–1716.
- [7] J.S. Bonifacino, R. Rojas, Retrograde transport from endosomes to the transGolgi

network, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 568–579.

[8] W.J. Brown, J. Goodhouse, M.G. Farquhar, Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes, *J. Cell Biol.* 103 (1986) 1235–1247.

[9] G. Hermeijer, The Vps10p-domain receptor family, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 2677–2689.

[10] C.N. Arighi, L.M. Hartnell, R.C. Aguilar, C.R. Haft, J.S. Bonifacino, Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor, *J. Cell Biol.* 165 (2004) 123–133.

[11] M.N. Seaman, Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer, *J. Cell Biol.* 165 (2004) 111–122.

[12] M.N. Seaman, E.G. Marcusson, J.L. Cereghino, S.D. Emr, Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products, *J. Cell Biol.* 137 (1997) 79–92.

[13] P.J. McCormick, K. Dumaresq-Doiron, A.S. Pluvinet, V. Pichette, G. Tosato, S. Lefrançois, Palmitoylation controls recycling in lysosomal sorting and trafficking, *Traffic* 9 (2008) 1984–1997.

[14] M.E. Linder, R.J. Deschenes, Palmitoylation: policing protein stability and traffic, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 74–84.

[15] G. Triola, H. Waldmann, C. Hedberg, Chemical biology of lipidated proteins, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 87–99.

[16] Y. Mosesson, Y. Yarden, Monoubiquitylation: a recurrent theme in membrane

protein transport, *Isr. Med. Assoc. J.* 8 (2006) 233–237.

[17] A. Hershko, A. Ciechanover, A. Varshavsky, Basic Medical Research Award. The ubiquitin system, *Nat. Med.* 6 (2000) 1073–1081.

[18] J.H. Hurley, S.D. Emr, The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35 (2006) 277–298.

[19] Y. Tanaka, N. Tanaka, Y. Saeki, K. Tanaka, M. Murakami, T. Hirano, N. Ishii, K. Sugamura, c-Cbl-dependent monoubiquitination and lysosomal degradation of gp130, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 4805–4818.

[20] D. Scheuring, F. Kunzl, C. Viotti, M. San Wan Yan, L. Jiang, S. Schellmann, D.G. Robinson, P. Pimpl, Ubiquitin initiates sorting of Golgi and plasma membrane proteins into the vacuolar degradation pathway, *BMC Plant Biol* 12 (2012) 164.

[21] A.J. Shirk, S.K. Anderson, S.H. Hashemi, P.F. Chance, C.L. Bennett, SIMPLE interacts with NEDD4 and TSG101: evidence for a role in lysosomal sorting and implications for Charcot–Marie–Tooth disease, *J. Neurosci. Res.* 82 (2005) 43–50.

[22] Y. Pak, W.K. Glowacka, M.C. Bruce, N. Pham, D. Rotin, Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination, *J. Cell Biol.* 175 (2006) 631–645.

[23] A. Kirisits, D. Pils, M. Krainer, Epidermal growth factor receptor degradation: an alternative view of oncogenic pathways, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 2173–2182.

[24] M.C. Bruce, V. Kanelis, F. Fouladkou, A. Debonneville, O. Staub, D. Rotin,

Regulation of Nedd4-2 self-ubiquitination and stability by a PY motif located within its HECT-domain, *Biochem. J.* 415 (2008) 155–163.

[25] A. Magnifico, S. Ettenberg, C. Yang, J. Mariano, S. Tiwari, S. Fang, S. Lipkowitz, A.M. Weissman, WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 43169–43177.

A1.7 Figures

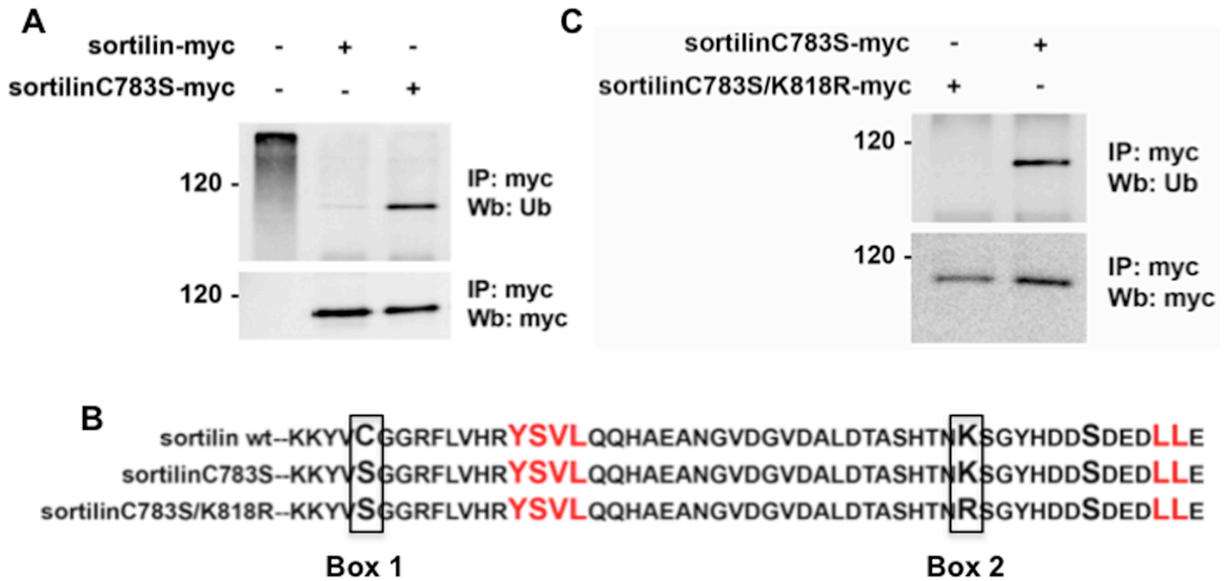


Figure A1.1 Non-palmitoylated sortilin is ubiquitinated at lysine 818.

(A) HeLa cells were transfected with either sortilin-myc or sortilinC783S-myc as indicated. Following an immunoprecipitation (IP) using anti-myc antibody, the samples were run on a 12% polyacrylamide gel and Western blotted (Wb) with either anti-ubiquitin or anti-myc antibodies. The first lane is total cell lysate used as a positive control for the anti-ubiquitin antibody. (B) The amino acids sequence of the cytosolic tail of wild-type sortilin, sortilinC783S and sortilinC783S,K818R highlighting the site of palmitoylation (cysteine 783, Box 1) and the predicted site of ubiquitination (lysine 818, Box 2). (C) HeLa cells were transfected with either sortilin-myc or sortilinC783S,K818R. Whole cell lysate was immunoprecipitated (IP) with anti-myc antibody and Western blotted (Wb) with anti-ubiquitin and anti-myc antibodies.

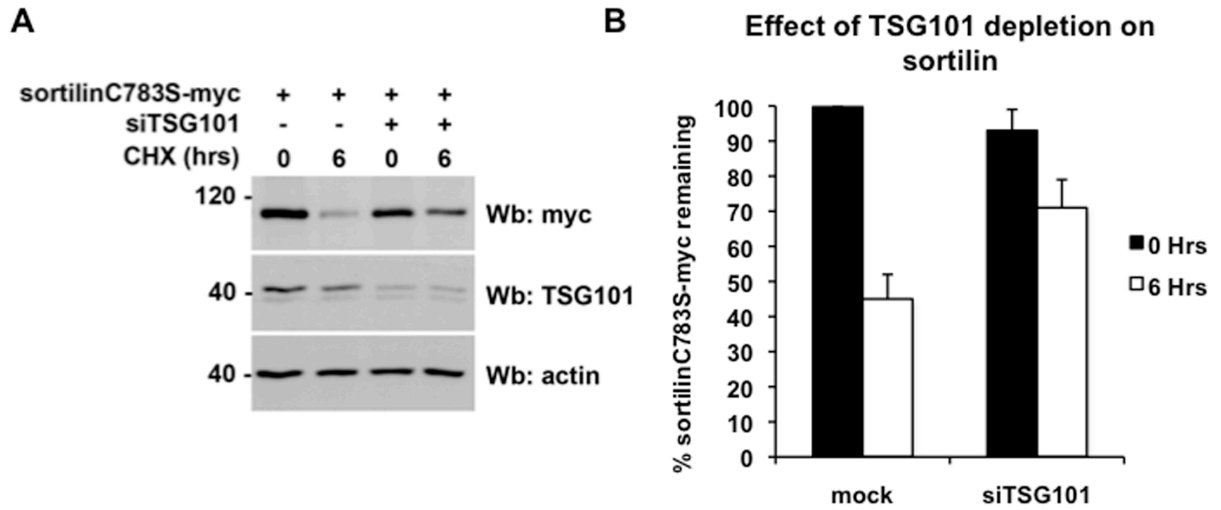


Figure A1.2 Depletion of TSG101 prevents the degradation of sortilin.

(A) HeLa cells were depleted or not depleted of TSG101 by siRNA and subsequently transfected with sortilinC783S-myc. The cells were then incubated with 50 μ g/ml of cycloheximide for the time indicated. Equal amounts of protein were loaded on a 12% acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membranes and subsequently Western blotted with anti-myc, anti-TSG101 and anti-actin (to serve as a loading control) antibodies. (B) Quantification of the level of sortilinC783S-myc from 3 separate experiments as described in (A). Error bars represent \pm standard deviation.

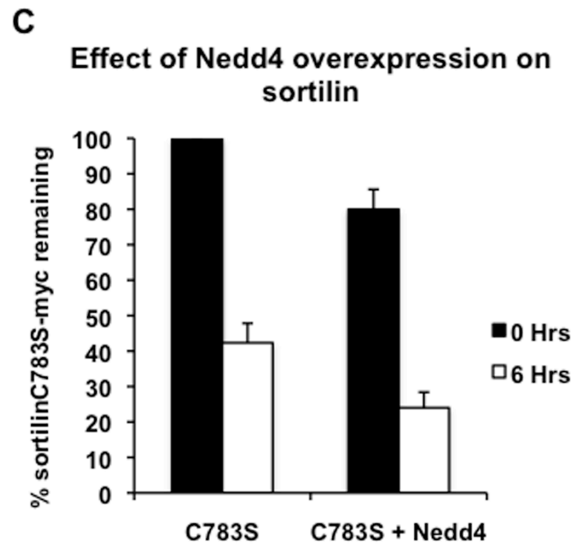
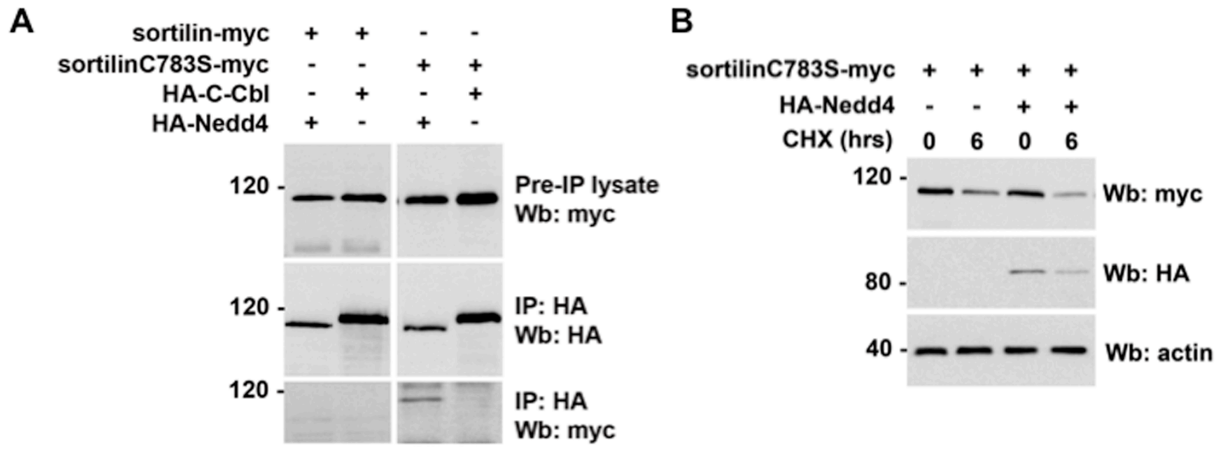


Figure A1.3 Overexpression of Nedd4 results in increased degradation of sortilin.

(A) Wild-type sortilin-myc or sortilinC783S-myc were transfected into HeLa cells with either HA-c-Cbl or HA-Nedd4. Whole cell lysate was immunoprecipitated (IP) with anti-HA antibody. Samples were loaded on a 12% acrylamide gel and membranes were Western blotted (Wb) with anti-HA and anti-myc antibodies. (B) HeLa cells transfected with sortilinC783S-myc were co-transfected or not with HA-Nedd4 and a 6 h cycloheximide chase was performed. Equal amount of proteins were loaded on a 12% acrylamide gel and

membranes were blotted with anti-myc, anti-HA and anti-actin (to serve as a loading control) antibodies. (C) Quantification of the level of sortilinC783S-myc from 3 separate experiments as described in B. Error bars represent \pm standard deviation.

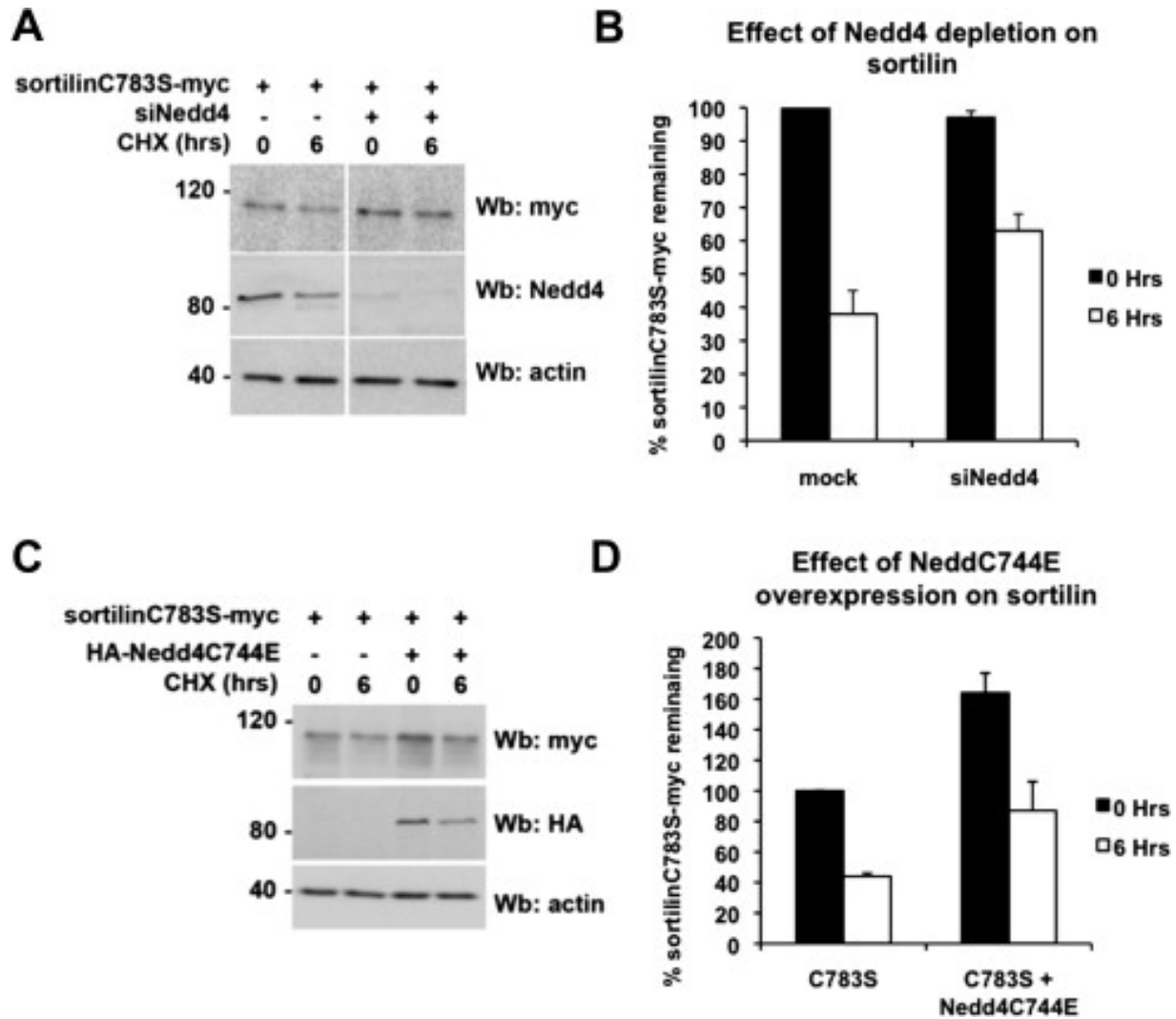
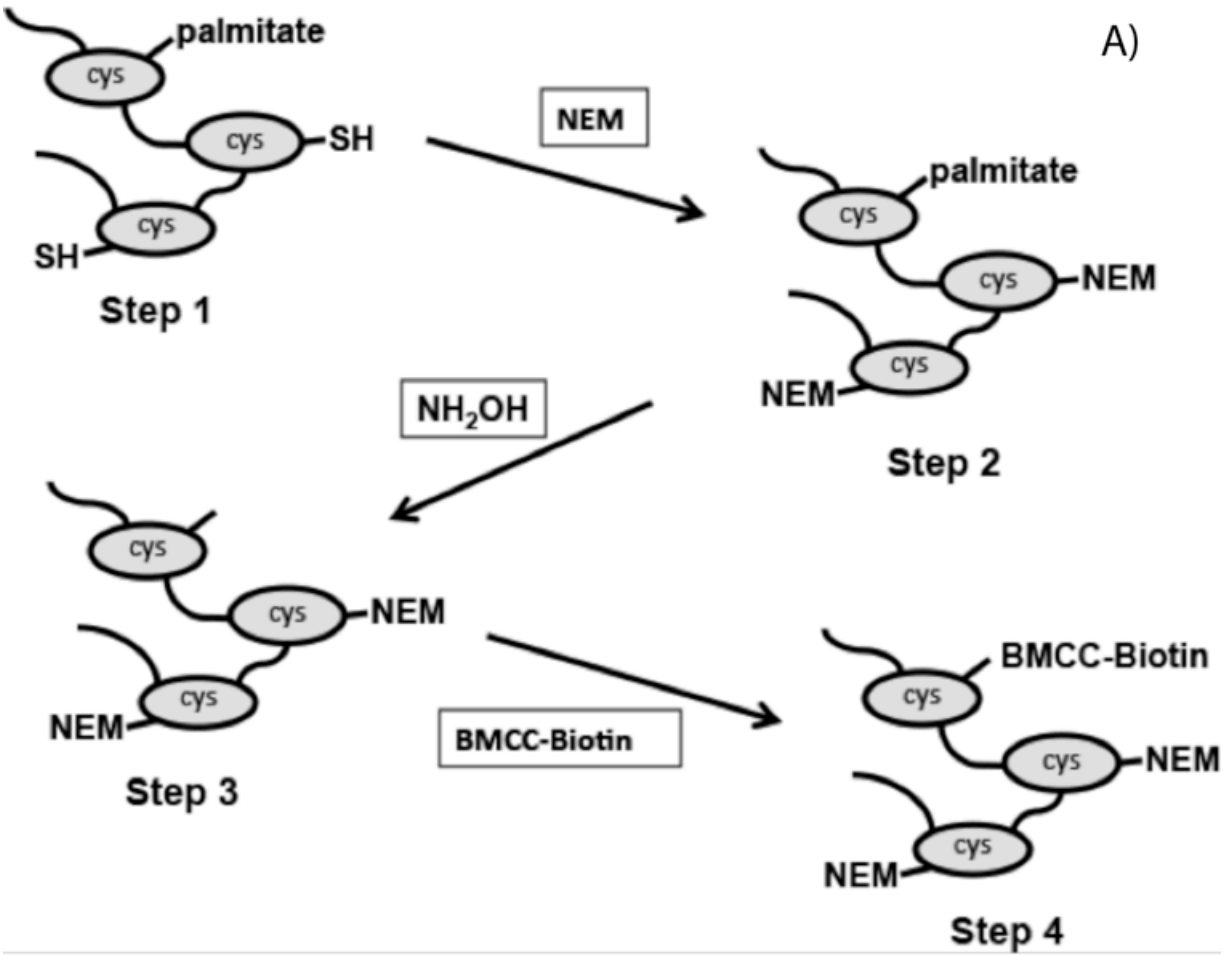


Figure A1.4 The ubiquitin ligase activity of Nedd4 is required to degrade sortilin.

(A) HeLa cells were depleted of Nedd4 or not as indicated and transfected with sortilinC783S-myc. A 6 h cycloheximide chase was performed and equal amounts of proteins were loaded on a 12% acrylamide gel. Membranes were blotted with anti-myc, anti-Nedd4 and anti-actin (to serve as a loading control) antibodies. (B) Quantification of the level of sortilinC783S-myc from 3 separate experiments as described in A. Error bars represent \pm standard deviation. (C) SortilinC783S-myc was co-transfected (or not) in HeLa cells with HA-Nedd4C744E and a

6-h cycloheximide chase was performed and equal amount of proteins were loaded on a 12% acrylamide gel. Membranes were blotted with anti-myc, anti-HA and anti-actin as a loading control. (D) Quantification of the level of sortilinC783S-myc from 3 separate experiments as described in (C). Error bars represent \pm standard deviation.

Annexe 2 : Résultats non-publiés



B)

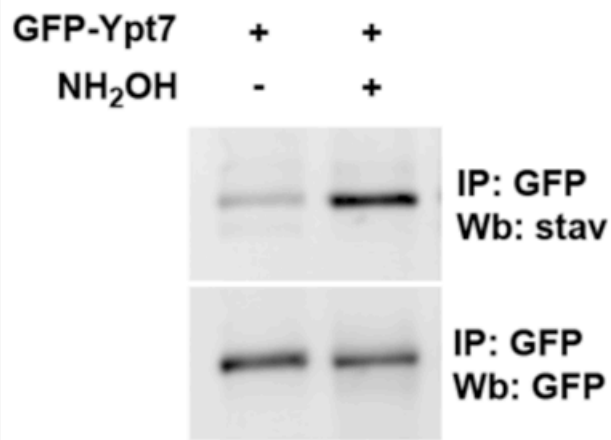


Figure A2.1 Ypt7p est palmitoylé.

A) Schéma de l'expérience d'échange acyle-biotine. Étape 1 : purification des protéines et blocage des cystéines libres avec le N-éthylmaleïmide (NEM). Étape 2 : traitement des protéines avec l'hydroxylamine pour cliver les résidus de palmitate. Étape 3 : incubation des protéines ayant des cystéines nouvellement libres avec la biotine-BMCC. Étape 4 : Western blot pour détecter la biotine remplaçant les résidus de palmitate. B) Des levures *S. cerevisiae* exprimant GFP-Ypt7 ont été lysées et GFP-Ypt7 a été purifié par immunoprécipitation en un anticorps contre l'étiquette GFP. L'expérience d'échange acyle-biotine a ensuite été performée avec la moitié de l'échantillon traité sans hydroxylamine. Un Western blot a ensuite été performé pour détecter la biotine. Stav : Streptavidine.

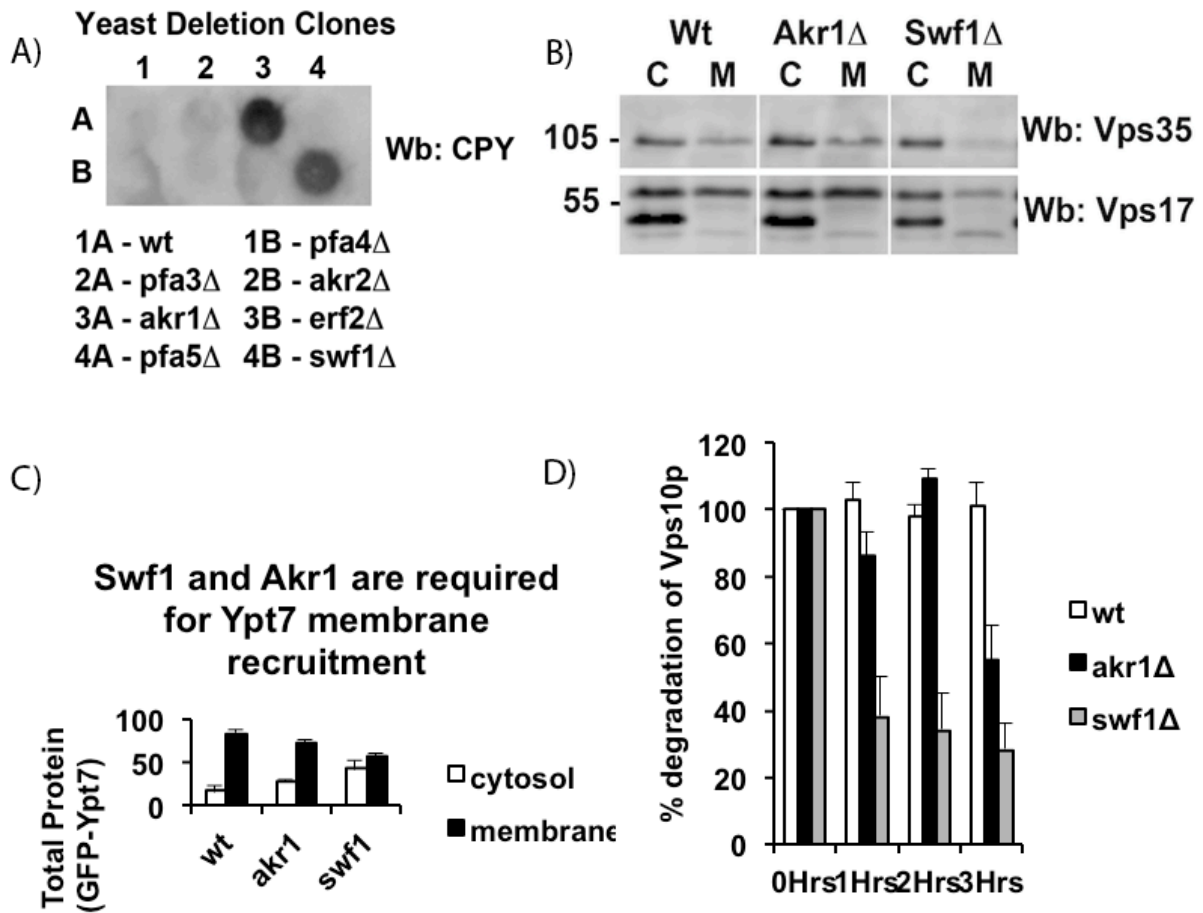


Figure A2.2 La palmitoylation chez la levure.

A) Une membrane de nitrocellulose a été déposée sur 8 colonies de levures délétés des gènes encodant les protéines indiquées. La sécrétion de CPY a ensuite été détectée par Western blot avec un anticorps contre CPY. B) Expérience de séparation membranaire sur des lysats de levures WT, Δ Akr1 ou Δ Swf1. Marquage après Western blot avec des anticorps contre Vps35 ou Vps17.

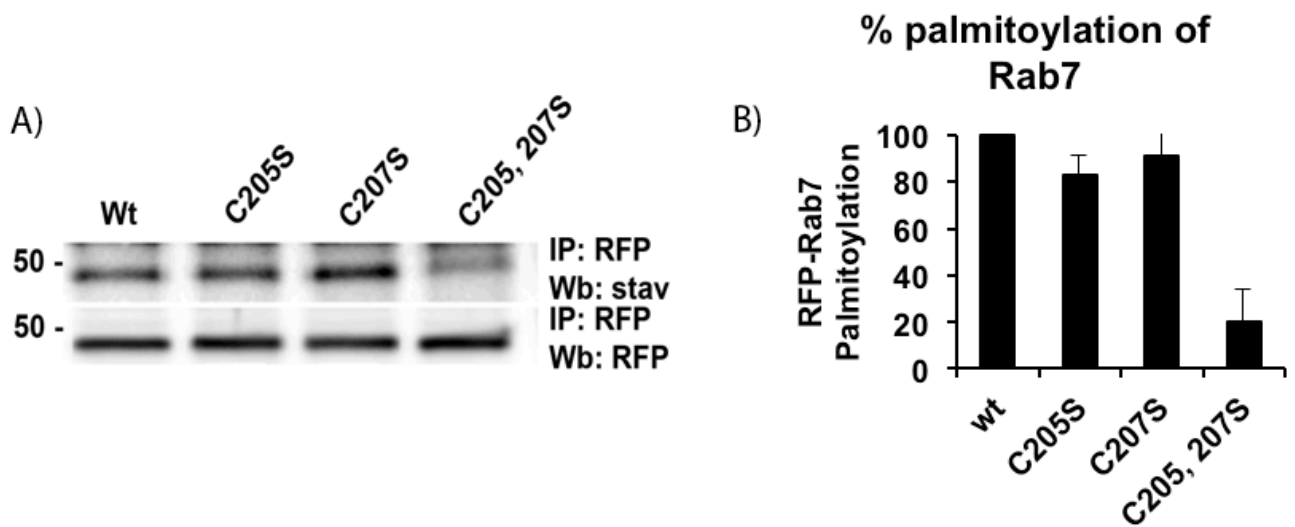


Figure A2.3 Rab7 est palmitoylé.

A) Western blot d'une expérience d'échange acyle-biotine. Des cellules HeLa ont été transfectées avec RFP-Rab7 et les mutants indiqués. 24 h après la transfections les cellules ont été lysées et l'expérience d'échange d'acyle-biotine a été performée. B) Quantification avec le logiciel ImageJ de trois expériences comme décrit en A). Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne Wt : wild-type, C205S :RFP-Rab7C205S, C207S : RFP-Rab7C207S, C205,207S : RFP-Rab7C205,207S, stav : streptavidine.

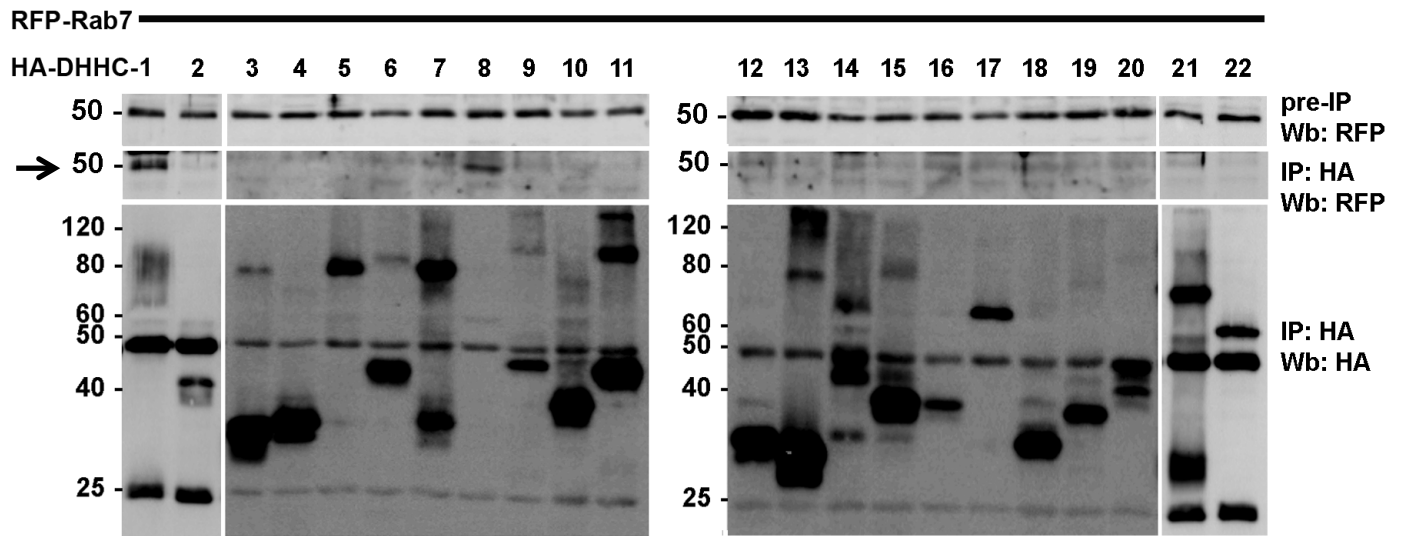


Figure A2.4 Rab7 interagit avec DHHC1 et DHHC8.

Résultats de co-immunoprécipitation. Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec des constructions de HA-DHHC-1 à -22 ainsi que RFP-Rab7. 24 H après la transfections les cellules ont été récoltées, lysées et incubées pendant la nuit avec un anticorps monoclonal contre HA. Les échantillons ont ensuite été séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide et l'interaction avec RFP-Rab7 évalué par Western blot avec un anticorps contre RFP.

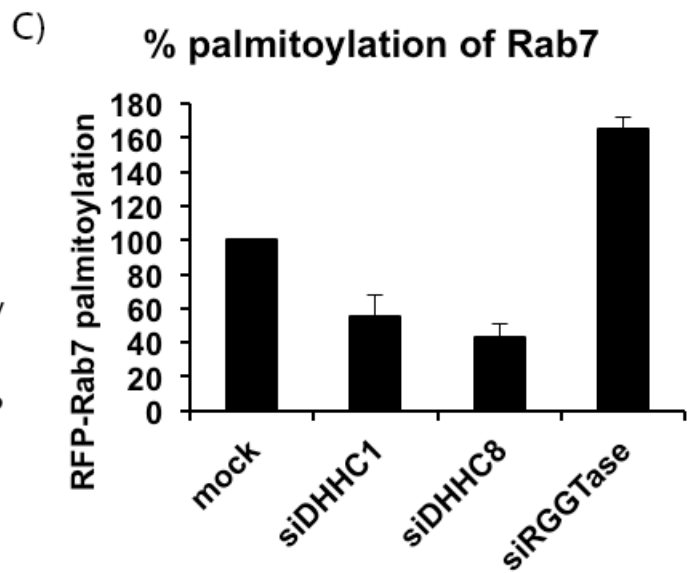
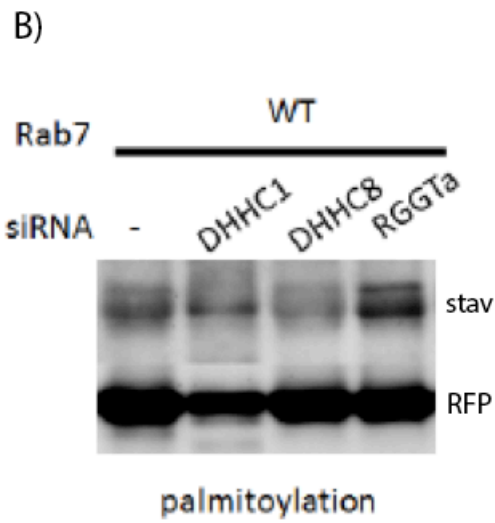
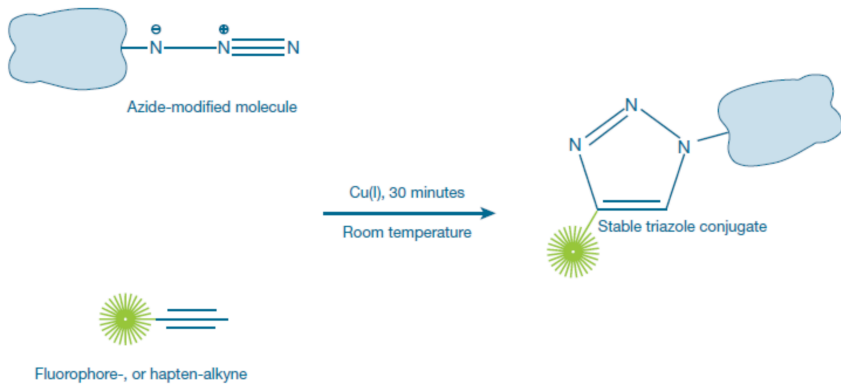
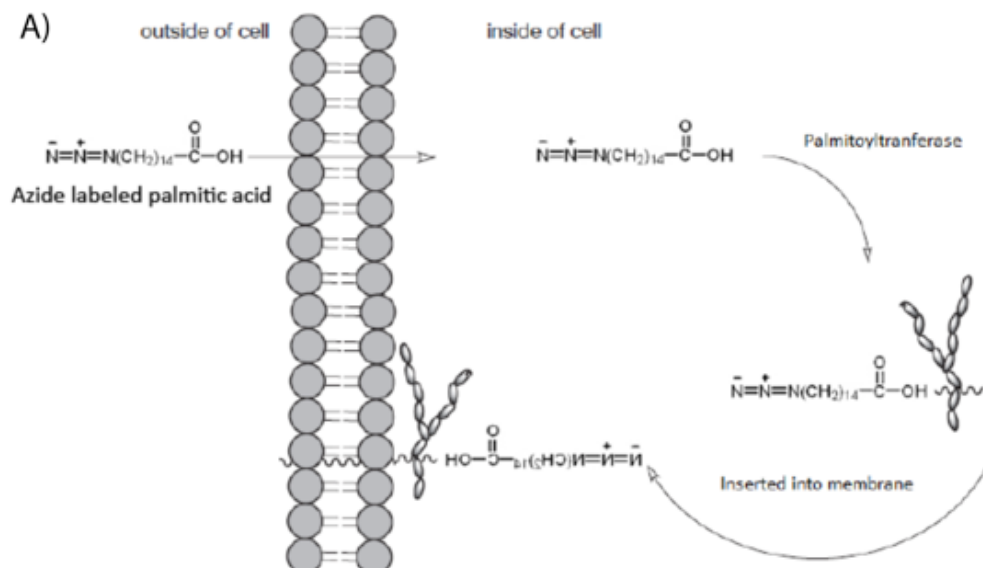


Figure A2.5 La délétion des DHHC diminue la palmitoylation de Rab7.

A) Schéma décrivant la réaction de Click. Les cellules sont d'abord cultivées en présence d'acide palmitique modifié par un groupement azoture qu'elles incorporent et utilisent pour palmitoyler les protéines. Après la lyse des cellules une réaction de Click catalysée par du cuivre est performée avec une molécule de biotine contenant un groupement alcyne et les protéines marquées par le groupement azoture. B) Résultats de la réaction de Click. Des cellules HeLa ont été transfectées avec des siRNA contre DHHC1, DHHC8 ou RGGT α et 24 h plus tard une expérience de Click a été performée et la palmitoylation de Rab7 détecté par Western blot avec la streptavidine. C) Quantification de 3 expériences comme décrit en B). Les barres d'erreurs représentent l'écart à la moyenne. WT : Wild-type, Stav : Streptavidine

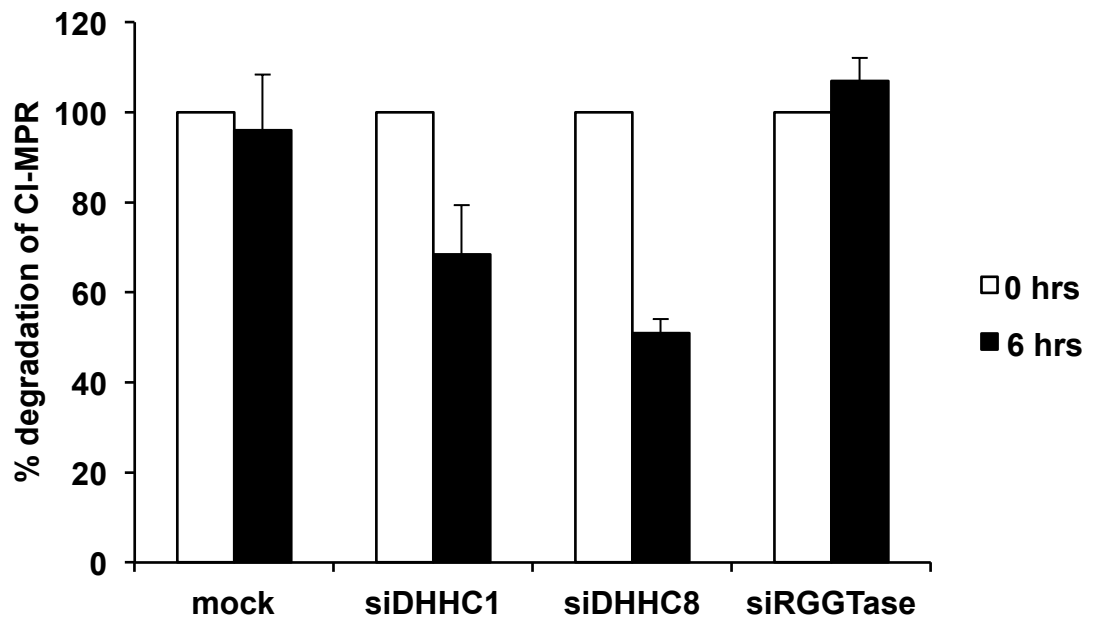


Figure A2.6 La délétion de DHC1 et DHC8 cause la dégradation de CI-MPR.

Quantification avec le logiciel ImageJ de trois Western blot. Des cellules HeLa ont été transfectées avec des siRNA contre DHC1, DHC8 ou RGGTa. 24 h après les transfections la moitié des cellules transfectées ont été incubées durant 6 heures avec du cycloheximide. La quantité de CI-MPR a ensuite été mesuré par Western blot en utilisant un anticorps contre CI-MPR.

