



**HAL**  
open science

# L'étude du rôle et de l'expression de la protéine autophagique GABARAPL1 dans le système nerveux central et dans des modèles de cellules neuronales

Jaclyn Nicole Le Grand

► **To cite this version:**

Jaclyn Nicole Le Grand. L'étude du rôle et de l'expression de la protéine autophagique GABARAPL1 dans le système nerveux central et dans des modèles de cellules neuronales. Neurobiologie. Université de Franche-Comté, 2013. Français. NNT : 2013BESA3016 . tel-01825694

**HAL Id: tel-01825694**

**<https://theses.hal.science/tel-01825694v1>**

Submitted on 28 Jun 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE  
UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE BESANCON

**Doctorat de l'Université de Franche-Comté**  
**Sciences de la Vie et de la Santé**

Ecole doctorale Homme, Environnement, Santé

**L'étude du rôle et de l'expression de la  
protéine autophagique GABARAPL1 dans  
le système nerveux central et dans des  
modèles de cellules neuronales**

**THESE**

Soutenance prévue le 13 Juin 2013

Par

**Jaclyn Nicole Le Grand**

**Membres du jury :**

**Rapporteurs**

Dr. Bruno Gonzalez, Directeur de Recherche, INSERM, ERI28, Université de Rouen

Dr. Christian Gaiddon, Directeur de Recherche, INSERM, U692, Université de Strasbourg

**Examineurs**

Dr. Frédéric Brischoux, Chercheur, INSERM, U1028, Université de Claude Bernard Lyon

Dr. Isabelle Lascombe, Maître de Conférences, Université de Franche-Comté

**Directeur de thèse**

Pr. Régis Delage-Mourroux, Professeur des Universités, Université de Franche-Comté

**Co-directeur de thèse**

Dr. Michaël Boyer-Guittaut, Maître de Conférences, Université de Franche-Comté





# **SOMMAIRE**

---



<b>SOMMAIRE</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATIONS ET ACRONYMES</b>	<b>6</b>
<b>CADRE ET BUT DU TRAVAIL</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
<b>I GABARAPL1</b>	<b>21</b>
1. HISTORIQUE	21
2. REGULATION DU GENE <i>GABARAPL1</i>	22
2.1 Régulation par les estrogènes	22
2.2 Régulation par les facteurs de transcription FOXO	24
2.3 Régulation par les rythmes circadiens	27
2.4 Régulation par E2F1	28
3. EXPRESSION DU GENE <i>GABARAPL1</i>	29
3.1 Expression de gabarapl1 dans les tissus normaux	29
3.2 Expression de gabarapl1 dans les conditions pathologiques	31
4. EXPRESSION DE LA PROTEINE GABARAPL1	33
4.1 Les protéines de la sous-famille GABARAP	33
4.2 Expression de la protéine GABARAPL1	34
5. ROLES DE LA PROTEINE GABARAPL1	36
5.1 Rôle dans le transport des récepteurs	38
5.2 Autres rôles dans le transport	42
5.3 Rôle au cours de l'autophagie	42
5.4 Rôle dans la prolifération cellulaire et le cancer	44
<b>II AUTOPHAGIE</b>	<b>44</b>
1. HISTORIQUE	44
2. FORMES D'AUTOPHAGIE	46
2.1 L'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA)	46
2.2 La microautophagie	47
2.3 La macroautophagie	48
3. MECANISME MOLECULAIRE DE LA MACROAUTOPHAGIE	49
3.1 Induction/Nucléation	50
3.2 Elongation	55
3.3 Maturation et Dégradation	59
4. L'AUTOPHAGIE SELECTIVE	60
4.1 Les Adaptateurs des Substrats Ubiquitinylés	62
4.2 La Mitophagie	64

<b>III L'AUTOPHAGIE NEURONALE</b>	<b>67</b>
1. L'AUTOPHAGIE NEURONALE BASALE	67
1.1 L'autophagie neuronale et le protéasome	67
1.2 Modèles neuronaux déficients pour l'autophagie	68
1.3 L'homéostasie des synapses	70
1.4 L'homéostasie des axones	71
2. L'AUTOPHAGIE NEURONALE INDUITE	72
2.1 L'autophagie induite par la carence en nutriments	72
2.2 Autophagie et neurodégénérescence	73
2.3 Autophagie, stress mitochondrial et ROS	74
<b>RESULTATS</b>	<b>77</b>
<b>I RECHERCHE D'UN ANTICORPS ANTI-GABARAPL1 SPECIFIQUE</b>	<b>79</b>
PUBLICATION I : GABARAPL1 (GEC1) ANTIBODIES : TARGET ONE PROTEIN, GET ONE FREE !	81
<b>II ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE GABARAPL1 DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL MURIN CHEZ L'ADULTE ET CHEZ L'EMBRYON</b>	<b>89</b>
PUBLICATION II : SPECIFIC DISTRIBUTION OF THE AUTOPHAGIC PROTEIN GABARAPL1/GEC1 IN THE DEVELOPING AND ADULT MOUSE BRAIN AND IDENTIFICATION OF NEURONAL POPULATIONS EXPRESSING GABARAPL1/GEC1	91
<b>III ETUDE DU ROLE DE GABARAPL1 EN CONDITIONS DE STRESS DANS UN MODELE IN VITRO DE LIGNEE CELLULAIRE NEURONALE STABLE</b>	<b>133</b>
1. ETABLISSEMENT ET CARACTERISATION D'UNE LIGNEE CELLULAIRE STABLE SK-N-BE(2) EXPRIMANT LA PROTEINE DSRED-GABARAPL1	135
2. L'ETUDE DE LA REPOSE AUTOPHAGIQUE SUITE A DIFFERENTS TRAITEMENTS INDUISANT UN STRESS MITOCHONDRIAL DANS LES CELLULES SK-N-BE(2) ET SK-N-BE(2) DSRED-GABARAPL1	139
3. EFFET DE LA SUREXPRESSION DE GABARAPL1 SUR LA VIABILITE CELLULAIRE EN CONDITIONS DE STRESS MITOCHONDRIAL	141
<b>DISCUSSION</b>	<b>145</b>
<b>I EXPRESSION DE GABARAPL1 DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>147</b>
1.1 EXPRESSION DE GABARAPL1 CHEZ L'EMBRYON DE SOURIS	148
1.1.1 GABARAPL1 et prolifération cellulaire	148
1.1.2 GABARAPL1 et différenciation neuronale	149
1.2 EXPRESSION DE GABARAPL1 CHEZ LA SOURIS ADULTE	150
1.2.1 Le transport de récepteurs neuronaux par GABARAPL1	151
1.2.2 GABARAPL1 et l'autophagie neuronale	152

1.2.3 Expression de GABARAPL1 dans les noyaux moteurs et la substantia nigra pars compacta (SNpc)	154
1.2.4 Expression de GABARAPL1 dans l'hypothalamus et les neurones à GnRH	156
<b>II GABARAPL1 ET STRESS MITOCHONDRIAL</b>	<b>158</b>
2.1 GABARAPL1 ET MITOPHAGIE	160
2.1.1 La mitophagie dépendante de NIX	160
2.1.2 La mitophagie dépendante de PINK1/PARKIN	161
2.1.3 Le rôle de DsRed-GABARAPL1 dans la dégradation autophagique	161
2.2 LES INCONVENIENTS DE NOS MODELES	162
2.2.1 La surexpression de DsRed-GABARAPL1	162
2.2.2 Le CCCP	162
<b>III PERSPECTIVES</b>	<b>163</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>165</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>197</b>
<b>PUBLICATIONS</b>	<b>199</b>
PUBLICATION III : GABARAPL1 (GEC1) ORIGINAL OR COPYCAT?	201
PUBLICATION IV : GABARAPL1 (GEC1) ASSOCIATES WITH AUTOPHAGIC VESICLES	213
PUBLICATION V : IDENTIFICATION OF HSP90 AS A NEW GABARAPL1 (GEC 1)-INTERACTING PROTEIN	227
<b>COMMUNICATIONS ORALES</b>	<b>241</b>
<b>COMMUNICATIONS AFFICHEES</b>	<b>243</b>
<b>RESUMES</b>	<b>251</b>



# **ABREVIATIONS ET ACRONYMES**

---





<b>6-OHDA</b> : 6-hydroxydopamine	<b>CLOCK</b> : circadian locomotor output cycle kaput
<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>CMA</b> : chaperon mediated autophagy
<b>ADNc</b> : acide désoxyribonucléique complémentaire	<b>CNV</b> : copy number variations
<b>AFX</b> : acute leukemia fusion gene located in chromosome X	<b>CRY</b> : cryptochrome
<b>AIM</b> : ATG8 interacting motif	<b>DFCP1</b> : double FYVE-containing protein 1
<b>AKT</b> : akr t cell lymphoma	<b>DEPTOR</b> : DEP-domain-containing and mTOR-interactive protein
<b>ALFY</b> : autophagy linked FYVE protein	<b>DMEM</b> : dulbecco's modified eagle's medium
<b>AMBRA1</b> : activating molecule in beclin1-regulated autophagy 1	<b>DVL2</b> : <i>dishevelled 2</i>
<b>AMPA</b> : alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4- isoxazole-propionic acid	<b>E<sub>2</sub></b> : estradiol-17 $\beta$
<b>AMPK</b> : adenosine monophosphate protein kinase	<b>EBSS</b> : earl's balanced salt solution
<b>APE1</b> : aminopeptidase 1	<b>EGFR</b> : epidermal growth factor receptor
<b>AP-1</b> : activator protein-1	<b>eOBSC</b> : embryonic olfactory bulb stem cells
<b>ARH</b> : autosomal recessive hypercholesterolemia	<b>EP3.f</b> : prostaglandin E <sub>2</sub> receptor EP3 subtype
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>ER<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b> : estrogen receptor $\alpha$ / $\beta$
<b>AT1</b> : angiotensin receptor type 1	<b>ERE</b> : estrogen response element
<b>ATG</b> : autophagy	<b>ERK</b> : extracellular-signal-regulated kinase
<b>BafA1</b> : bafilomycine A1	<b>FasL</b> : Fas ligand
<b>BARKOR</b> : beclin1-associated autophagy-related key regulator	<b>FGFR</b> : fibroblast growth factor receptor
<b>BCL-2</b> : $\beta$ cell lymphomas 2	<b>FIP200</b> : focal adhesion kinas-family-interacting protein of 200 kDa
<b>BCL-xL</b> : $\beta$ cell lymphomas-extra large	<b>FKHRL1</b> : forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1
<b>BECLIN1</b> : coiled-coil, moesin-like Bcl-2 interacting protein	<b>FOXO</b> : forkhead box <i>transcription factors of the O class</i>
<b>BIF-1</b> : BAX-interacting factor-1	<b>FRE</b> : FOXO-recognized element
<b>BIM</b> : Bcl-2 interacting mediator of cell death	<b>FSH</b> : follicle-stimulating hormone
<b>BMAL1</b> : brain and muscle ARNT-like protein 1	<b>FYCO1</b> : FYVE and coiled-coil domain containing 1
<b>BNIP3</b> : Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3	<b>GABA<sub>A</sub></b> : $\gamma$ -aminobutyric acid type A
<b>BNIP3L</b> : Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like	<b>GABARAP</b> : GABA <sub>A</sub> receptor-associated protein
<b>CCCP</b> : carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone	<b>GABARAPL</b> : GABARAP like
<b>ChIP</b> : chromatin immunoprecipitation	<b>GADD45 <math>\alpha</math></b> : growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 $\alpha$
<b>CHO</b> : Chinese hamster ovary	
<b>CHX</b> : cycloheximide	

<b>GATE16</b> : golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa	<b>MPTP</b> : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
<b>GEC1</b> : glandular epithelial cell 1	<b>mSIN1</b> : mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1
<b>GFP</b> : green fluorescent protein	<b>mTOR</b> : mammalian target of rapamycin
<b>GluR1</b> : glutamate receptor type 1	<b>mTORC1/2</b> : mammalian target of rapamycin complex 1/2
<b>GnRH</b> : gonadotropin-releasing hormone	<b>NBR1</b> : neighbour of BRCA1
<b>GnV-3</b> : GnRH/v-myc clone 3	<b>NDP52</b> : nuclear dot protein 52kDa
<b>GPCR</b> : G protein-coupled receptors	<b>NGF</b> : nerve growth factor
<b>GPR30</b> : G-protein coupled receptor 30	<b>NIX</b> : <i>NIP3-like protein X</i>
<b>GSK3</b> : glycogen synthase kinase 3 $\beta$	<b>NSF</b> : N-ethylmaleimide-sensitive factor
<b>GST</b> : glutathione S-transferase	<b>OATL1</b> : ornithine aminotransferase-like 1
<b>HDAC6</b> : histone deacetylase 6	<b>ORF</b> : open reading frame
<b>HRS</b> : hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate	<b>p150</b> : PI3-kinase p150 subunit
<b>HSC70</b> : heat shock cognate 70	<b>PARKIN</b> : parkinsonien protein 2
<b>HSP</b> : heat shock protein	<b>PAS</b> : pre-autophagosomal structure
<b>IGF1</b> : insulin-like growth factor 1	<b>pb</b> : paire de bases
<b>IGFBP1</b> : insulin-like growth factor binding protein 1	<b>PB1</b> : Phox et Bem1p
<b>INR</b> : initiator element	<b>PE</b> : phosphatidyléthanolamine
<b>kb</b> : kilobase	<b>PER</b> : period
<b>kDa</b> : kiloDalton	<b>PI3K</b> : phosphatidylinositol 3 kinase
<b>KOR</b> : $\kappa$ -opioid receptor	<b>PI3P</b> : phosphatidyl-inositol-3-phosphate
<b>LAMP2A</b> : lysosomal-associated membrane protein type 2A	<b>PINK1</b> : PTEN-induced putative kinase 1
<b>LC3</b> : light chain 3	<b>PKB</b> : protein kinase B
<b>LDL</b> : low density lipoprotein	<b>PRAS40</b> : proline-rich akt substrate of 40 kDa
<b>LH</b> : luteinizing hormone	<b>PRIP1</b> : <i>Phospholipase C-related inactive protein 1</i>
<b>LIR</b> : LC3-interacting domain	<b>PTEN</b> : phosphatase and tensin homologue
<b>MAP1B</b> : microtubule-associated protein 1B	<b>RAB33B-GAP</b> : Ras-related protein in the brain 33B-GTPase activating protein
<b>MAP1LC3B</b> : microtubule-associated protein 1 light chain 3B	<b>RAPTOR</b> : regulatory associated protein of mTOR
<b>MAPK</b> : mitogen-activated protein kinase	<b>REV-ERB<math>\alpha</math></b> : reverse orientation c-erbA-1 gene $\alpha$
<b>MCF-7</b> : michigan cancer foundation-7	<b>RH</b> : hormonal receptors
<b>MEF</b> : mouse embryonic fibroblasts	
<b>MFN1/2</b> : mitofusin 1/2	
<b>mLST8</b> : mTOR associated protein, mammalian LST8 homolog	
<b>MnSOD</b> : manganese superoxide dismutase	

**RICTOR** : rapamycin-insensitive companion of mTOR  
**ROR** : retinoic acid-related orphan receptor  
**ROS** : reactive oxygen species  
**RT-PCR** : reverse transcription polymerase chain reaction  
**siRNA** : small interfering RNA  
**SNC** : système nerveux central  
**SNARE** : soluble NSF attachment protein receptor  
**SNpc** : substantia nigra pars compacta  
**SOD1** : superoxide dismutase 1  
**SP-1** : promoter-specific transcription factor-1  
**SQSTM1** : *sequestosome 1*  
**STBD1** : starch binding domain-containing protein 1  
**TECPR1** : tectonin  $\beta$ -propeller repeat containing 1  
**TIGAR** : TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator

**TMP** : 2,2,4-trimethylpentane  
**TOR** : target of rapamycin  
**TRANSFAC** : transcription factor database  
**UBA** : ubiquitin associated domain  
**UBL** : ubiquitin-like proteins  
**ULK1/2** : unc51-like kinase 1/2  
**UNC-51** : uncoordinated family member 51  
**UTR** : untranslated region  
**UVRAG** : ultraviolet irradiation resistance-associated gene  
**VDAC1** : voltage-dependent anion channel 1  
**VPS34** : vacuolar protein sorting 34  
**WIPI** : wd-repeat protein interacting with phosphoinositides  
**WNT** : wingless-integration 1 pathway



# **CADRE ET BUT DU TRAVAIL**

---



Ce travail de thèse, débuté en décembre 2009, s'inscrit dans la thématique de l'équipe EA3922 «Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central» et concerne l'étude de la protéine GABARAPL1 dans le système nerveux central et dans des modèles de cellules neuronales.

Notre équipe a identifié le gène *gec1* (*glandular epithelial cell 1*) de cobaye au début des années 1990 lors de la recherche de nouveaux gènes estrogéno-dépendants par un criblage d'une banque d'ADNc provenant de cellules d'endomètre de cobaye stimulées par les estrogènes (Pellerin et al., 1993). Le gène *gec1* présente au niveau nucléique 79% d'identité avec le gène *gabapap* (*GABA<sub>A</sub> receptor associated protein*). *gec1* a donc été renommé *gabapap1* pour *gabapap-like 1 protein* et a été classé dans la sous-famille *gabapap*, comprenant déjà les gènes *gabapap*, *gabapap2* et *gabapap3* (Xin et al., 2001). A ce jour, *gabapap1* est l'unique membre de la sous-famille *gabapap* identifié comme étant régulé par les estrogènes.

Les protéines de la sous-famille GABARAP présentent également une très grande similarité de structure. La forte identité de séquence au niveau protéique entre GABARAPL1 et GABARAP rend l'immunodétection spécifique de ces protéines particulièrement difficile. En revanche, les ARNm de ces gènes possèdent des UTR-3' qui ne présentent pas d'homologie significative, une caractéristique que notre équipe a exploité afin d'étudier l'expression de ces gènes. Les études de l'expression de *gabapap* et *gabapap1*, par hybridation *in situ* grâce à des sondes spécifiques d'une partie des UTR-3', ont démontré que ces gènes sont exprimés d'une manière ubiquitaire mais à des niveaux différents. En effet, *gabapap* présente une expression importante dans les tissus endocrines alors que *gabapap1* est exprimé préférentiellement dans le SNC (système nerveux central) (Nemos et al., 2003). De plus, *gabapap1* est le transcrit le plus exprimé dans le cerveau de rat comparé à tous les autres membres de la famille *atg8* (Tolle et al., 2008).

Des expériences menées au sein de notre équipe ont démontré que GABARAPL1, comme GABARAP, interagit avec la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> et la tubuline (Mansuy et al., 2004), suggérant que GABARAPL1 pourrait également participer au transport du récepteur GABA<sub>A</sub>. D'autres études ont démontré un rôle de GABARAPL1 dans le transport des récepteurs aux  $\kappa$ -opioïdes (Chen et al., 2006).



Outre son rôle dans le transport des récepteurs, GABARAP joue un rôle au cours de l'autophagie, un processus de dégradation intracellulaire impliquant la formation des vésicules à doubles membranes, les autophagosomes. Un travail effectué dans notre équipe, auquel j'ai participé, a récemment démontré que GABARAPL1 est également impliquée dans la formation des autophagosomes.

Les partenaires protéiques de GABARAPL1 identifiés jusqu'ici suggèrent un rôle important au niveau de l'activité et l'homéostasie des neurones en participant au transport de récepteurs et au processus d'autophagie. Ainsi, l'étude de l'expression de la protéine GABARAPL1 dans le SNC et son rôle au cours de l'autophagie neuronale présentait un intérêt majeur.

Mon travail de thèse a donc eu pour but :

- d'étudier la spécificité des anticorps commerciaux anti-GABARAPL1 disponibles afin d'identifier un outil d'immunodétection spécifique à cette protéine d'intérêt *in vitro* et *in vivo* ;
- d'étudier l'expression de GABARAPL1 dans le SNC murin au cours du développement et chez l'adulte et de caractériser les populations neuronales exprimant cette protéine ;
- d'étudier l'effet de la surexpression de GABARAPL1 dans un modèle *in vitro* neuronal en conditions de stress mitochondrial induisant l'autophagie.

# **INTRODUCTION**

---

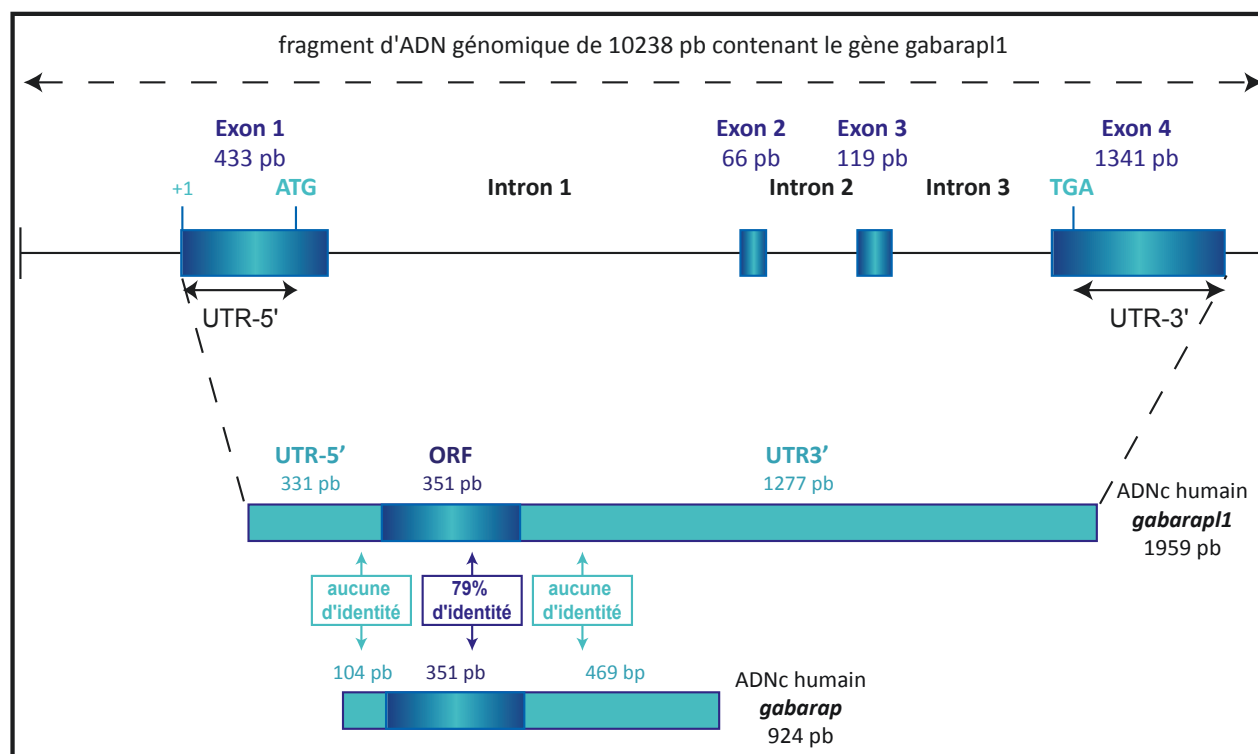


# I GABARAPL1

## 1. Historique

Le gène *gabaryl1* (*γ-aminobutyric acid receptor-associated protein like 1*), originellement appelé *gec1* (*glandular epithelial cell 1*), a été identifié au cours d'un criblage différentiel d'une banque d'ADNc réalisée à partir de cellules épithéliales glandulaires d'endomètre de cobaye (GEC). Dans ces expériences, une banque d'ADNc a été constituée à partir de GEC stimulées par de l'estradiol-17β (E<sub>2</sub>) et de la cycloheximide (CHX). Le criblage de la banque par la technique d'hybridation différentielle a permis d'identifier l'ARNm *gec1*. Ces expériences avaient pour but d'identifier des gènes régulés précocement par les estrogènes (Pellerin *et al.*, 1993).

L'organisation du gène *gabaryl1* de cobaye a été déterminée à partir d'un criblage d'une banque d'ADN génomique de cobaye. L'orthologue *gec1* humain a été identifié par criblage d'une banque d'ADNc d'origine placentaire à l'aide de la sonde produite chez le cobaye (Vernier-Magnin *et al.*, 2001). Le gène humain *gabaryl1*, situé sur le chromosome 12, est constitué de 1959 pb et est composé de 4 exons et 3 introns. La partie codante de l'ADNc du gène *gabaryl1* humain présente 79% d'identité avec celle de l'ADNc *gabaryl* (*γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*) humain (Wang *et al.*, 1999) (**Figure 1**). C'est à cause de cette forte identité de séquence que le gène *gec1* a été renommé *gabaryl1*. Ces deux gènes, avec le gène *gabaryl2/gate-16* (*GABARAP-like 2 / golgi-ATPase associated enhancer de 16 kDa*) (Sagiv *et al.*, 2000) et le pseudogène *gabaryl3* (*GABARAP-like 3*), du fait de leur forte identité de séquence, appartiennent tous à la famille *gabaryl* (Xin *et al.*, 2001). Cette famille des gènes *gabaryl* constitue l'une des deux sous-familles des gènes de la famille *atg8* (*autophagy-related 8*). La deuxième sous-famille appelée *lc3* (*light chain 3*) est composée des gènes *lc3A*, *lc3B* et *lc3C*. Les protéines de ces deux sous-familles ont été décrites pour jouer un rôle important dans la formation des vésicules autophagosomales.



**Figure 1 : Organisation du gène *gabrapl1* humain et représentation des ADNc humains *gabrapl1* et *gabrap*.** Le gène *gabrapl1* humain est représenté par des lignes (introns) et rectangles (exons). Les positions des codons d'initiation (ATG) et de terminaison (TGA) de la traduction sont indiquées. Les ADNc humains de *gabrapl1* et *gabrap* sont représentés par trois rectangles correspondants à l'UTR-5', l'ORF et UTR-3'. Le pourcentage d'identité entre ces séquences est indiqué.

## 2. Régulation du gène *gabrapl1*

Il a été démontré que l'expression du gène *gabrapl1* peut être régulée par différents facteurs de transcription, comme le récepteur aux estrogènes, les facteurs de transcription FOXO (*forkhead box transcription factors of the O class*), les facteurs de transcription de l'horloge circadienne et le facteur de transcription E2F1.

### 2.1 Régulation par les estrogènes

Les estrogènes jouent un rôle important dans plusieurs processus physiologiques tels que le développement des organes reproducteurs féminins, la progression du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire (Lubahn et al., 1993; Ogawa et al., 1998). Ces hormones ont également été associées à la progression de certains cancers comme le cancer du sein, de l'utérus et de la prostate (Castagnetta et al., 2004; Harkonen and Makela, 2004; Platet et al.,

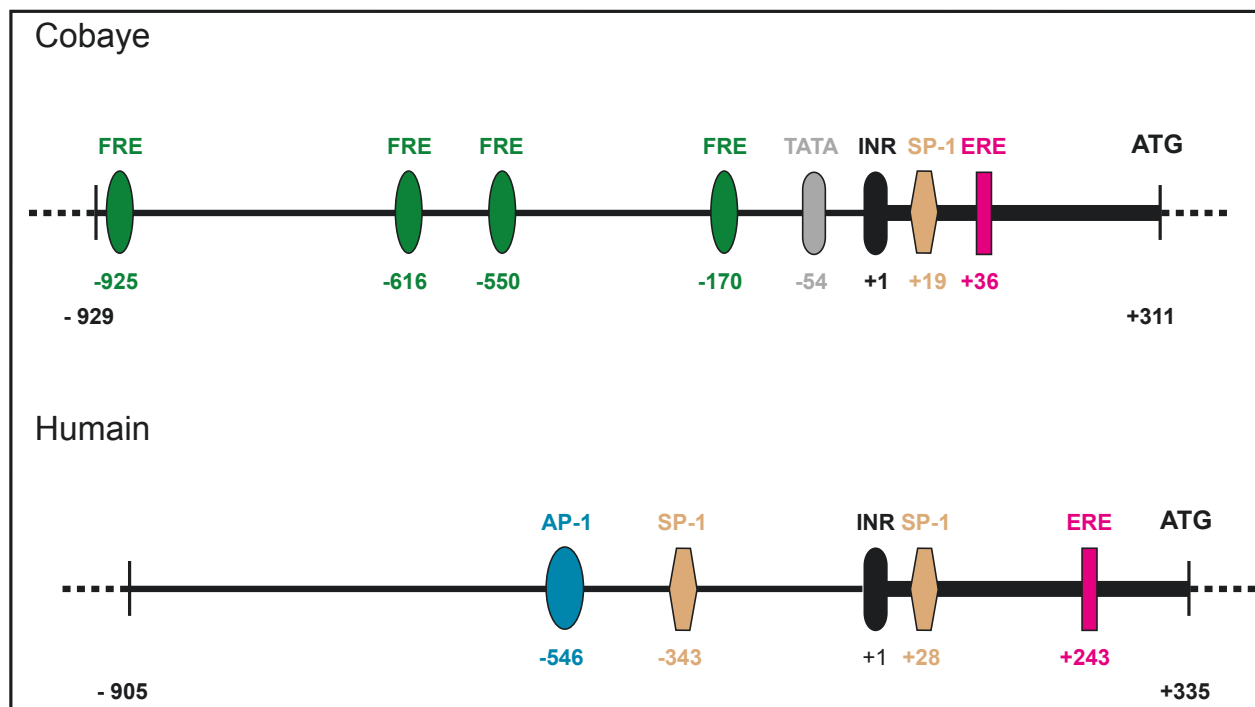
2004). Les estrogènes se lient aux récepteurs aux estrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$  (*estrogen receptor  $\alpha/\beta$* ), qui activent la transcription *via* une séquence d'ADN cis-régulatrice spécifique appelée ERE (élément de réponse aux estrogènes). Ces récepteurs sont également capables d'activer indirectement la transcription de gènes qui ne possèdent pas de séquence ERE *via* d'autres éléments cis-régulateurs, tels que SP-1 (*promoter-specific transcription factor-1*) et AP-1 (*activator protein-1*) (O'Malley, 2005; Zhao et al., 2010).

Comme mentionné précédemment, le gène *gabaryl1* a été identifié comme un gène régulé positivement et précocement par les estrogènes puisque sa transcription est induite par l'estradiol 17- $\beta$  en présence de CHX (Pellerin *et al.*, 1993).

Cette induction de l'expression du gène *gabaryl1* a aussi été confirmée dans un autre modèle cellulaire de cellules isolées d'un phéochromocytome de rat différenciées en cellules neuronales par le NGF (*nerve growth factor*) et exprimant de façon stable ER $\alpha$  (PC12-ER $\alpha$ ) (Tolle, thèse, 2008). La régulation transcriptionnelle de *gabaryl1* par les estrogènes a ensuite été démontrée *in vivo*. Des expériences effectuées dans notre équipe ont montré que l'expression de l'ARNm *gabaryl1* est augmentée dans le cervelet, le tronc cérébral et le diencéphale chez des rates ovariectomisées traitées aux estrogènes (Tolle, thèse, 2008). Par ailleurs, une expérience d'hybridation soustractive a également permis de montrer que l'expression de l'ARNm *gabaryl1* est augmentée dans l'hypothalamus du cobaye après un traitement de 24 heures avec des estrogènes (Malyala et al., 2004; Malyala et al., 2005).

La région de 1 500 pb en amont du codon d'initiation de traduction du gène de cobaye *gabaryl1* a été clonée. Une séquence ERE (*estrogen response element*) située au niveau du premier exon du gène entre les résidus +36/+50 a été identifiée et a été montrée comme suffisante pour induire l'expression de ce gène par ER $\alpha$ . Dans ces expériences, des cellules CHO (cellules d'adénocarcinome d'ovaire de hamster chinois) ont été co-transfectées avec un fragment d'ADN génomique de cobaye contenant le motif ERE et avec un vecteur d'expression codant ER $\alpha$  ou ER $\beta$ . La mesure de l'activité luciférase a montré une augmentation d'un facteur 2 après traitement par E<sub>2</sub>, uniquement dans les cellules co-transfectées par ER $\alpha$  (Vernier-Magnin et al., 2005). En outre, une analyse *in silico* des séquences cis-régulatrices du gène humain *gabaryl1* à l'aide des programmes Cister (Frith et al., 2001) ou MatInspector de Genomatix (Cartharius et al., 2005) a permis d'identifier une séquence ERE à +243 ainsi que deux sites SP-1 (-343, +28) et un site AP-1 (-546) en amont de l'ERE (**Figure 2**). Il a été noté que, parmi tous les gènes *atg8*, *gabaryl1* est le seul gène qui

contienne des séquences cis-régulatrices cibles des estrogènes dans la région de 1 200 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Le Grand et al., 2011).



**Figure 2 : Représentation des séquences cis-régulatrices présentes dans les fragments d'ADN génomique de 1240 pb en amont du codon d'initiation de la traduction des gènes *gabarapl1* de cobaye et humain.** AP-1 : Activator Protein-1 ; ERE : Élément de Réponse aux Estrogènes ; FRE : FOXO-Recognized Element ; INR : élément initiateur de la transcription ; SP-1 : Promoteur-Specific transcription factor-1. D'après Le Grand *et al.* (2011).

## 2.2 Régulation par les facteurs de transcription FOXO

Les facteurs de transcription FOXO, FOXO1/FKHR (*forkhead in rhabdomyosarcomas*), FOXO3/FKHRL1 (*forkhead in rhabdomyosarcoma-like 1*), FOXO4/AFX (*acute leukemia fusion gene located in chromosome X*) et FOXO6 appartiennent à la famille des régulateurs de transcription forkhead et contiennent tous un domaine de liaison à l'ADN appelé « domaine Forkhead» (Clark et al., 1993; Kaestner et al., 2000). Ces facteurs contrôlent la régulation d'expression des gènes en se liant à la séquence FRE (*FOXO-recognized element*, [C/G][A/T]AAA[C/A]A) (Furuyama et al., 2000). Ces facteurs de transcription jouent un rôle dans diverses fonctions cellulaires telles que la différenciation, la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, le métabolisme, la survie, l'apoptose et le stress oxydatif (Accili and Arden, 2004; Barthel et al., 2005; Greer and Brunet, 2005). Ces facteurs sont

différentiellement exprimés dans les tissus : par exemple, FOXO1 est fortement exprimée dans le tissu adipeux, FOXO3 dans le cerveau, FOXO4 dans le cœur et FOXO6 dans le cerveau embryonnaire (Furuyama *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 2003). Les facteurs de transcription FOXO régulent l'expression de plusieurs gènes, tels que FasL (*Fas ligand*), IGFBP1 (*insulin-like growth factor binding protein 1*), BIM (*BCL-2 interacting mediator of cell death*), GADD45 $\alpha$  (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 $\alpha$* ) et MnSOD (*manganese superoxide dismutase*) (Accili and Arden, 2004; Greer and Brunet, 2005; Salih and Brunet, 2008).

Le gène *gabarapl1* est aussi régulé par les différents membres de la famille FOXO. En effet, six séquences FRE ont été identifiées dans la région de 5 000 pb en amont du site d'initiation de transcription chez la souris. Sur six séquences analysées, trois séquences peuvent être reconnues directement par FOXO3 (Zhao *et al.*, 2007). De même, des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP, *chromatin immunoprecipitation*) effectuées sur des cultures néonatales de cardiomyocytes de rats en conditions de carence de nutriments, ont montré que FOXO1 et FOXO3 pouvaient se fixer sur une séquence FRE sur le promoteur du gène *gabarapl1* et ont donc confirmé la présence d'au moins une séquence FRE fonctionnelle dans la partie promotrice (Sengupta *et al.*, 2009). Enfin, l'analyse de la séquence de 1240 pb en amont du site d'initiation de la transcription du gène *gabarapl1* de cobaye avec les programmes Cister et MatInspector (Frith *et al.*, 2001; Cartharius *et al.*, 2005) a révélé la présence de quatre sites potentiels FRE mais aucun dans le gène humain (Le Grand *et al.*, 2011) (**Figure 2**). Cependant, des sites FRE sont présents dans une région plus éloignée de 2-3 kb en amont de l'ATG chez le gène humain.

Les facteurs FOXO jouent également un rôle important dans la régulation des gènes impliqués dans les processus autophagiques. Par exemple, Sengupta *et al.* ont montré le rôle de FOXO1 et FOXO3 dans la régulation transcriptionnelle positive des gènes de l'autophagie (*atg* pour *autophagy related gene*) dans des cardiomyocytes de rats ainsi que dans le tissu cardiaque de souris soumis à une privation de glucose ou à un stress oxydatif. Dans ces études, les chercheurs ont démontré que FOXO1 et FOXO3 sont déphosphorylées par la kinase AKT (*akt t cell lymphoma*) et sont relocalisées dans le noyau où ils activent la transcription des gènes autophagiques *gabarapl1*, *atg12* et *lc3* (Sengupta *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2011). Par contre, l'expression de l'ARNm *gabarapl1* et l'expression des protéines GABARAPL1 et LC3 sont diminuées dans des cardiomyocytes de souris invalidés pour les gènes *foxo1* et *foxo3* après une ischémie (Sengupta *et al.*, 2011).



La régulation transcriptionnelle des gènes liés à l'autophagie, y compris *gabarapl1*, par les facteurs de transcription FOXO a également été décrite dans des tissus musculaires soumis à une carence en nutriments ainsi que chez des rats atteints de cancers, de diabète ou de problèmes rénaux. Des études de microarray ont montré que les ARNm *lc3* et *gabarapl1*, ainsi que d'autres gènes liés à l'autophagie, étaient augmentés dans le tissu musculaire atrophié de rats soumis à une carence en nutriments ainsi que dans le tissu musculaire de modèles murins de cancer, de diabète et de problèmes rénaux (Lecker et al., 2004). Par ailleurs, l'expression des ARNm et des protéines des gènes *lc3* et *gabarapl1* peut être induite par la surexpression d'une forme constitutivement active du facteur de transcription FOXO3 (ca-FOXO3) dans un modèle *in vitro* de cellules de myotubes C2C12 (Zhao et al., 2007). L'expression des transcrits de *lc3* et *gabarapl1* est également régulée positivement dans le muscle squelettique atrophié de souris suite à une dénervation ou après 24 heures de privation en nutriments (Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007). De façon similaire, l'expression des gènes autophagiques, y compris *gabarapl1* et *lc3*, est induite dans le muscle squelettique de la truite arc-en-ciel après 14 jours de privation en nutriments ainsi que dans les myocytes de truite privés de sérum (Seiliez et al., 2010). Cependant, les expériences *in vitro* sur ces myocytes ont montré que les formes phosphorylées de FOXO1 et FOXO3 (séquestrées dans le cytosol et donc inactives) étaient légèrement augmentées après privation de sérum comparativement aux cellules contrôles. Cela suggère que l'induction des gènes autophagiques dans ce modèle ne serait pas directement due à l'action des facteurs de transcription FOXO. Néanmoins, la phosphorylation des FOXO induite par un traitement avec l'IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) entraîne une réduction des transcrits *gabarapl1* d'un facteur 1,5 dans ce modèle cellulaire.

Le rôle des facteurs FOXO a également été démontré chez la souris présentant une hyperinsulinémie (Liu et al., 2009). En effet, certains gènes autophagiques, y compris *gabarapl1*, sont plus exprimés dans le foie de la souris présentant une résistance à l'insuline. Dans un modèle *in vitro* d'hépatocytes soumis à une carence en nutriments ou en glucagon, les niveaux d'ARNm de *gabarapl1* sont réduits après traitement avec l'insuline. La surexpression d'une forme nucléaire de FOXO1 inverse les effets de l'insuline sur l'expression du transcrit *gabarapl1*.

Finalement, la régulation de transcription de *gabarapl1* dépendant de FOXO1 a également été démontrée dans les cellules cancéreuses. Par exemple, une étude récente a

démontré un lien entre FOXO3A, l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et p38 $\alpha$  MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) dans des modèles cellulaires de cancer colorectal (les cellules HT29 et les cellules LS174T) au cours de la réponse au stress. Un inhibiteur spécifique de la p38 $\alpha$  kinase (SB20219) a été utilisé pour étudier son effet sur l'expression des gènes cibles de FOXO3A. Certains gènes autophagiques tels que *gabap1*, *gabap*, *lc3* et *atg12* sont induits dans ces conditions et *gabap1* présente le taux d'expression le plus élevé (Chiacchiera et al., 2009; Chiacchiera and Simone, 2009).

### 2.3 Régulation par les rythmes circadiens

Les rythmes circadiens sont des rythmes biologiques oscillant sur une durée d'environ 24 heures. Ces rythmes biologiques sont gouvernés par une horloge interne, aussi appelée horloge circadienne. Chez les mammifères, l'horloge circadienne centrale est située au niveau du noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus mais il existe aussi des générateurs d'oscillations intracellulaires au sein de plusieurs organes périphériques tels que le foie, le cœur, le rein ou le pancréas (Reppert and Weaver, 2002; Storch et al., 2002). L'horloge circadienne dirige principalement le cycle veille/sommeil mais aussi la température interne, la sécrétion d'hormones, le rythme cardiaque et la fonction rénale (Ripperger and Schibler, 2001; Reppert and Weaver, 2002; Gachon et al., 2004).

Le mécanisme d'horloge circadienne chez les mammifères implique la régulation (positive et négative) de la transcription rythmique des ARNm des composants principaux de l'horloge. Parmi ces composants, se trouvent les facteurs de transcription CLOCK (*circadian locomotor output cycle kaput*) et BMAL1 (*brain and muscle ARNT-like protein 1*) (Reppert and Weaver, 2002). Après leur hétérodimérisation, les facteurs CLOCK/BMAL1 sont relocalisés dans le noyau pour se lier sur la séquence cis-régulatrice E box (CACGTG) et pour activer la transcription des gènes périodes, *per1* et *per2* et des gènes cryptochromes, *cry1* et *cry2* (Gekakis et al., 1998). Les protéines PER et CRY sont localisées dans le noyau, où elles agissent comme des régulateurs négatifs en se liant directement à l'hétérodimère CLOCK/BMAL1 pour l'inhiber (Jin et al., 1999; Kume et al., 1999). L'hétérodimère CLOCK/BMAL1 active également la transcription du gène de récepteur nucléaire *rev-erba* (*reverse orientation c-erbA-1 gene  $\alpha$* ). La protéine REV-ERB $\alpha$  réprime alors la transcription du gène *bmal1* en se liant à l'élément de réponse *rev-erba*/ROR (*retinoic acid-related orphan receptor*) présent au niveau de la région promotrice de *bmal1* (Preitner et al., 2002).

La variation de l'expression du transcrite *gabap1* en fonction des rythmes circadiens a été démontrée dans deux publications. Dans la première, Mansuy *et al.* ont utilisé des neurones hypothalamiques à GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*) de rat immortalisées, les cellules GnV-3 (*GnRH/v-myc clone 3*), pour démontrer que l'expression de l'ARNm *gabap1* oscille de la même manière que les facteurs de transcription qui gouvernent l'horloge interne (*clock* et *per1*). De plus, l'inhibition du gène *per1* par shRNA entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm *gabap1* d'un facteur 2, ce qui suggère que l'expression rythmique de *gabap1* dans les cellules GnV-3 est dépendante de PER1 (Mansuy *et al.*, 2009). La deuxième étude a démontré que l'expression des transcrits *gabap1* est régulée pendant le cycle jour/nuit dans le foie murin. Les auteurs ont utilisé des techniques de micro-array et de northern-blot pour démontrer que l'expression de l'ARNm *gabap1* est maximale durant la phase lumineuse (jour) et minimale durant la phase d'obscurité (nuit). Cette expression rythmique de *gabap1* dans le foie est perdue chez des souris mutées pour le gène *clock*. Ce résultat suggère que le facteur de transcription CLOCK joue un rôle dans la régulation du gène *gabap1* (Sakao *et al.*, 2003).

#### 2.4 Régulation par E2F1

Le facteur de transcription E2F1 régule la transcription des gènes impliqués dans des processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire et l'apoptose (Rogoff and Kowalik, 2004). La régulation transcriptionnelle par E2F1 est aussi impliquée dans le contrôle de l'expression des gènes autophagiques tels que *ulk1*, *atg5*, *lc3* et *dram* (Polager *et al.*, 2008). A ce titre, une étude utilisant des constructions plasmidiques de promoteurs de 23 gènes humain *atg* clonés en amont de l'ADNc codant la luciférase a été effectuée. Dans cette étude, les auteurs ont co-transfecté les cellules HeLa avec ces différentes constructions et le vecteur pcDNA3-e2f1 (Kusama *et al.*, 2009). Les auteurs ont démontré que 13 gènes *atg* sur les 23 étudiés étaient régulés par le facteur de transcription E2F1 et que parmi ces 13 gènes, seul *gabap1* était régulé négativement. L'analyse *in silico* du promoteur *gabap1* humain par TRANSFAC (*transcription factor database*) a permis d'identifier une séquence cis-régulatrice putative de E2F1 dans une région de 339 pb en amont du site d'initiation de transcription.

### 3. Expression du gène *gabap1*

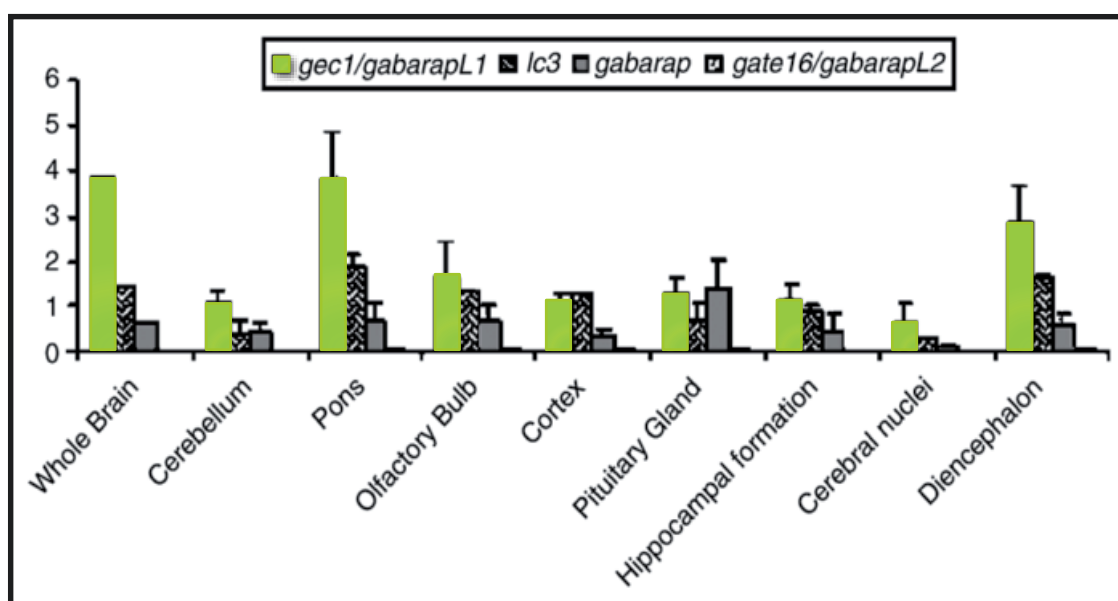
Comme mentionné précédemment, la partie codante de l'ADNc humain *gabap1* présente 79% d'identité avec celle de l'ADNc humain *gabap*. En revanche, il existe une très faible identité entre les régions non traduites (UTR-5' et UTR-3') de ces deux ADNc, permettant l'étude de l'expression de ces ARNm. En effet, des sondes spécifiques des régions UTR-3' de ces gènes ont pu être synthétisées afin d'étudier leur expression dans différents tissus humains et murins (Nemos *et al.*, 2003).

#### 3.1 Expression de *gabap1* dans les tissus normaux

Trois études concernant l'expression du gène *gabap1* ont démontré une expression ubiquitaire de son ARNm à des taux variables dans les tissus normaux. Chez le cobaye, des expériences de northern-blotting/hybridation ont démontré un taux élevé du messenger *gabap1* dans le foie, l'endomètre et les poumons (Vernier-Magnin *et al.*, 2001). Une deuxième étude chez la souris utilisant la même technique a démontré que l'ARNm *gabap1* est plus fortement exprimé dans les reins, le cœur, les testicules et le cerveau (Xin *et al.*, 2001). Chez l'humain, plusieurs études effectuées par northern-blotting/hybridation et macroarray ont démontré que l'expression de ce messenger est plus élevée dans le foie, les reins, la rate, les ovaires, le muscle squelettique, le cœur, le cerveau, les leucocytes et le placenta et est plus faible dans les tissus endocrines, les tissus fœtaux et les organes du système digestif (Xin *et al.*, 2001; Nemos *et al.*, 2003; Kusama *et al.*, 2009). Alors que l'ARNm *gabap1* humain est exprimé de manière différentielle dans les tissus adultes, il semble être exprimé à un niveau comparable dans tous les tissus fœtaux testés (Kusama *et al.*, 2009). Notre équipe a étudié l'expression des ARNm *gabap1* et *gabap* par macroarray dans 76 tissus humains (61 tissus normaux, 8 lignées cancéreuse et 7 tissus fœtaux) (Nemos *et al.*, 2003). Cette étude a démontré que, malgré leur expression ubiquitaire dans les tissus normaux, ces deux gènes sont très peu exprimés dans les tumeurs ainsi que dans les tissus fœtaux. Parmi les tissus normaux étudiés, on retrouve une très forte expression de l'ARNm *gabap1* dans différentes aires du cerveau telles que le cortex, le putamen, le pons, l'hippocampe et le lobe temporal.

Compte tenu de sa forte expression dans le SNC et en particulier dans le cerveau, deux études plus complètes de l'expression du messenger *gabap1* ont été effectuées par la suite. Dans une première étude effectuée chez le rat, une dissection du cerveau en neuf régions

distinctes (le bulbe olfactif, le cortex, l'hippocampe, les noyaux cérébraux, le diencéphale, le cervelet, le pons et la glande pituitaire) a permis de montrer des variations d'expression des ARNm *gabarapl1*, *gabarap*, *gabarapl2* et *lc3* par RT-PCR quantitative en temps réel (Mansuy-Schlick et al., 2006) (**Figure 3**). Ces expériences ont démontré que *gabarapl1* est le gène le plus exprimé dans le cerveau comparé à tous les autres gènes *atg8*, avec une plus forte expression dans le pons et le diencéphale.



**Figure 3 : Profil d'expression des ARNm des homologues mammifères d'*atg8* dans différentes aires de cerveau de rat par RT-PCR quantitative.** Les valeurs d'expression des ARNm sont normalisées par rapport au gène  $\gamma$ -actine et sont exprimées par rapport au taux d'ARNm *gabarapl1* dans le cervelet. D'après Tolle *et al.* (2008).

Au cours d'une seconde étude, une cartographie de l'expression de l'ARNm *gabarapl1* dans le cerveau murin a été effectuée par hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde d'ARN anti-sens spécifique de l'UTR-3' (Tolle *et al.*, 2008). L'expression du gène a été détectée dans toutes les régions du cerveau, du bulbe olfactif jusqu'au tronc cérébral. Le profil d'expression de *gabarapl1* obtenu dans cette étude suggère une expression uniquement neuronale avec une plus faible expression dans les neurones à fonctions sensorielles et une plus forte expression dans les neurones des fonctions somato-motrices ou des fonctions neuroendocrines. D'autres études ont montré que *gabarapl1* est exprimé à des niveaux élevés dans les neurones à GnRH de l'hypothalamus ainsi que dans les cellules GnV-3, une lignée neuronale immortalisée à partir de neurones à GnRH (Malyala *et al.*, 2004; Malyala *et*

*al.*, 2005; Mansuy *et al.*, 2009). Enfin, une étude plus récente a décrit une expression plus importante de *gabarapl1* dans les cellules GnV-3 différenciées en neurones à GnRH comparée à celle observée dans les cellules GnV-3 prolifératives (Mansuy *et al.*, 2011).

### 3.2 Expression de *gabarapl1* dans les conditions pathologiques

#### 3.2.1 Cancers

Comme montré précédemment dans l'étude effectuée par Nemos *et al.* (Nemos *et al.*, 2003), *gabarapl1* est peu ou pas exprimé dans huit lignées cellulaires cancéreuses humaines (des cellules HK-60, K-562 et MOLT-4 [issues de leucémies], des cellules Raji et Doudi [issues de lymphome de Burkitt's], des cellules HeLa S3 [issues d'un cancer de col de l'utérus], des cellules SW480 [issues d'un adénocarcinome colorectal] et des cellules A549 [issues d'un carcinome du poumon]). Dans cette étude, il a été également montré que l'expression du gène *gabarap* est diminuée dans les cellules cancéreuses mais cette diminution est moins importante que celle de *gabarapl1*. Dans le cadre d'une thèse effectuée au sein de notre équipe, la perte d'expression de la protéine GABARAPL1 a également été observée dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, y compris deux lignées dérivées de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB231), trois lignées dérivées de patients atteints de leucémies (HL60, NB4 et U937) et une lignée dérivée de neuroblastome (SK-B-BE[2]) (Chakrama, 2011).

L'expression du gène *gabarapl1* a, par la suite, été étudiée par RT-PCR quantitative dans 256 tumeurs du sein. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. Descotes du CHU Lyon Sud (Berthier *et al.*, 2010). Les résultats obtenus ont montré que l'expression de l'ARNm *gabarapl1* est significativement réduite dans les tumeurs de sein et que la forte expression de *gabarapl1* est corrélée à une augmentation de la survie des patientes atteintes de cancer du sein.

#### 3.2.2 Pathologies du système nerveux central

L'expression de l'ARNm *gabarapl1* est également dérégulée dans des modèles de maladies neurodégénératives. Par exemple, l'expression du transcrite est fortement réduite dans la partie compacte de la substance noire dans les cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson (Simunovic *et al.*, 2009). Son expression est également réduite dans le cortex préfrontal d'un modèle animal de Parkinson : le macaque traité avec du MPTP (*1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*) (Storvik *et al.*, 2010). De plus, une autre étude a

démonstré que la protéine GABARAPL1 peut se lier à la protéine  $\alpha$ -synucléine et préférentiellement aux oligomères d' $\alpha$ -synucléine (Schnack et al., 2008). La présence de ces oligomères de synucléine est une caractéristique de la progression des maladies à synucléopathies telles que la maladie de Parkinson ou la démence à corps de Lewy.

Plus récemment, une étude, qui avait pour but d'identifier des CNV (*copy number variations*) potentiellement pathogènes dans les génomes provenant d'une cohorte de patients européens atteints d'autisme (Griswold et al., 2012), a montré l'existence de 18 délétions larges (<1 Mb) notamment dans des gènes impliqués dans la signalisation GABAergique, dont le gène *gabarapl1*.

### 3.2.3 Syndrome de fatigue chronique

En 2005, une étude, qui avait pour but de déterminer les profils d'expression de gènes associés au syndrome de fatigue chronique, a montré une surexpression du transcrit *gabarapl1* dans les cellules mononucléaires de sang périphérique de patients atteints de cette maladie (Kaushik et al., 2005).

### 3.2.4 Pathologies musculaires

Le processus d'autophagie a été décrit comme étant induit durant l'atrophie musculaire et l'induction de plusieurs gènes autophagiques, dont celui de *gabarapl1*, a été observée dans des modèles *in vivo* et *in vitro* de ces pathologies (Lecker et al., 2004; Mammucari et al., 2007; Seiliez et al., 2010). De même, il a été montré que le transcrit *gabarapl1* est induit dans le muscle humain après une épreuve d'ultraendurance (Jamart et al., 2011). Par contre, l'expression de ce gène, ainsi que celle des gènes *lc3*, *atg12* et *bnip3* (*Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa protein interacting protein 3*), est inhibée dans les muscles de patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne et dans un modèle murin de cette maladie (De Palma et al., 2012). Par ailleurs, les gènes autophagiques *beclin1*, *lc3* et *gabarapl1* sont inhibés dans les muscles de patients atteints d'hémiplégie chronique, à la suite d'un infarctus cérébral (von Walden et al., 2012).

## 4. Expression de la protéine GABARAPL1

### 4.1 Les protéines de la sous-famille GABARAP

La protéine GABARAPL1 appartient à la sous-famille GABARAP qui est composée des protéines GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 et GABARAPL3. Ces protéines sont des petites protéines composées de 117 acides aminés qui possèdent un résidu glycine conservé en position 116. Ce résidu est important pour leur rôle au cours de la formation de l'autophagosome discutée ultérieurement. La séquence de la protéine GABARAPL1 est très conservée au cours de l'évolution des plantes aux mammifères avec 100 % d'identité entre la protéine de souris et humaine.

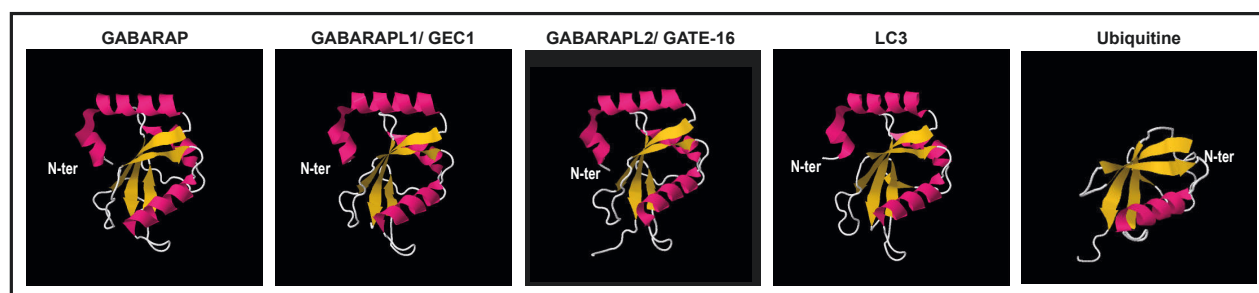
GABARAPL1	MKFQYKEDHHPFEYRKKEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARVPDLDKRKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARIGDLDDKKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLERHRCVESAKIRAKYPDRVPVIVEK-VSGSQIVDIDKRKYLVPSDITVAQF-60
LC3A	MKMRFFSSPCGKAAVDPADRCKEVQQIRDQHPSKIPIVI IERYKGEKQLPVLDTKFLVPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKIPIVI IERYKGEKQLPVLDTKFLVPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKIPVVVERYPRETFLPLDKTKFLVPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFKRAESERIADRFPKNRIPVICEK-AEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFFVN-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESVMGK-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFFVN-NVIPPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESVMGL-117
GABARAPL2	MWIRKRIQLPSEKAI FLFVD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEEDGFLYVAYS GENTFGF-117
LC3A	VKIIRRRQLNPTQAFLLVNHQSMVSVSTPIADIYEQEKDEEDGFLYMVYASQETFGF-125
LC3B	IKIIRRRQLNANQAFLLVNHGSMVSVSTPISEVYESEKDEEDGFLYMVYASQETFGMKLSV-125
LC3C	LSIIRSRMVLRAEFYLLVNNKSLVMSATMAEIRDYKDEEDGFVYMTYASQETFGCLESAAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VVIRKRIMLPPEKAIFIFVN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFLYVTYSGENTFGGR-117

**Figure 4 : Alignement des séquences de la protéine ATG8 et de ses homologues mammifères.** Les séquences des acides aminés des protéines GABARAPL1, GABARAP, GABARAPL2, LC3A, LC3B, LC3C chez l'humain et d'ATG8 chez la levure sont comparées. Les acides aminés indiqués en noir sont conservés entre les différentes protéines et ceux indiqués en rouges sont les acides aminés qui diffèrent de ceux présents dans la protéine GABARAPL1. La glycine C-terminale (en position 116) est indiquée en bleu. D'après Le Grand *et al.* (2011).

La forte identité de séquence entre les gènes de la sous-famille *gabarap* se traduit par une forte identité des séquences protéiques. La protéine GABARAPL1 présente 96 % d'identité avec la protéine GABARAPL3, 87 % d'identité avec la protéine GABARAP et 61 % d'identité avec GABARAPL2. Par contre, GABARAPL1 présente une identité de séquence plus éloignée avec les membres de la sous-famille LC3 : 31 %, 29 % et 36 % avec LC3A, LC3B et LC3C, respectivement. Finalement, GABARAPL1 présente 55 % d'identité avec la protéine



ATG8 de levure (Le Grand *et al.*, 2011) (**Figure 4**). De plus, toutes ces protéines présentent une forte homologie de structure tridimensionnelle. Les structures cristallographiques déterminées pour les protéines GABARAPL1 (Structural Genomic Consortium, pdb code:2R2Q), GABARAP (Knight *et al.*, 2002), GABARAPL2 (Paz *et al.*, 2000) et LC3 (Sugawara *et al.*, 2004) présentent de très fortes similarités et possèdent toutes deux hélices  $\alpha$  à l'extrémité N-terminale et des feuillets  $\beta$  à l'extrémité C-terminale. Malgré une faible homologie au niveau de la séquence primaire avec l'ubiquitine (Cook *et al.*, 1992), les structures tridimensionnelles présentent pourtant une similarité très importante et, à ce titre, les membres de la famille GABARAP sont ainsi considérés comme des *ubiquitin-like proteins* (UBL) (Coyle *et al.*, 2002) (**Figure 5**).



**Figure 5 : Structures tridimensionnelles des protéines GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, LC3 et ubiquitine.** Les structures cristallographiques des protéines ont été obtenues sur la RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>).

#### 4.2 Expression de la protéine GABARAPL1

La forte homologie de séquence et de structure de ces protéines, et en particulier l'homologie entre GABARAPL1 et GABARAP, rendent donc difficile l'obtention d'outils de détection spécifiques de ces protéines. En effet, ce problème a été souligné par différents articles qui décrivent une réactivité croisée des anticorps polyclonaux anti-GABARAP ou GABARAPL1 utilisés (Mansuy *et al.*, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Tolle *et al.*, 2008). Dans ces divers articles, les auteurs rapportent que les anticorps anti-GABARAP ou anti-GABARAPL1 ne discriminent pas les deux protéines dans les conditions testées. Par exemple, Wang *et al.* ont produit un anticorps anti-GABARAPL1 qu'ils ont décrit comme spécifique en immunofluorescence alors qu'il reconnaît également les protéines GABARAP et GABARAPL2 en western-blotting (Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Etant donné l'absence d'un anticorps spécifique pour étudier l'expression de

GABARAPL1, les expériences décrites dans la section suivante doivent être interprétées avec prudence puisqu'il est possible que la protéine détectée soit une de ces deux homologues, GABARAP ou GABARAPL2.

#### 4.2.1 Expression de GABARAPL1 étudiée par western-blotting

Le problème de spécificité d'anticorps peut néanmoins être contourné lorsque l'on travaille en western-blotting. En effet, alors que leurs masses moléculaires calculées sont identiques (14 kDa), la protéine GABARAPL1 migre plus lentement que la protéine GABARAP en SDS-PAGE, ce qui permet de séparer ces deux protéines lors d'une migration sur un gel d'acrylamide concentré (12 à 15 %). Les résultats de ces expériences révèlent typiquement deux ou plusieurs bandes qui doivent ensuite être identifiées comme les différentes formes de GABARAP et GABARAPL1 (formes -I et -II, voir chapitre sur l'autophagie), une étape qui est malheureusement souvent négligée.

Néanmoins, on peut citer les expériences suivantes qui ont étudié l'expression de la protéine endogène GABARAPL1 par la technique de western-blotting. Dans une première étude, l'expression de GABARAPL1 a été étudiée dans des tissus de cœur après implantation d'un appareil d'assistance ventriculaire chez des patients atteints de cardiomyopathie (Kassiotis et al., 2009). Dans ces conditions, le tissu cardiaque présente un besoin d'énergie réduit grâce à l'aide physique de l'appareil d'assistance, ce qui se traduit par une diminution de l'autophagie et par conséquent une diminution d'expression des protéines GABARAPL1 et LC3. A l'inverse, l'augmentation du processus de l'autophagie, et par conséquent de l'expression de la protéine GABARAPL1, a été décrite d'une part, dans des cardiomyocytes de rat nouveau nés cultivés en absence de glucose (Sengupta *et al.*, 2009) et d'autre part, dans des cellules HT29 (cellules cancéreuse de colon) après inhibition de la protéine kinase p38 $\alpha$  (Chiacchiera and Simone, 2009). Chez le rat, GABARAPL1 est fortement exprimée dans le cerveau (dans toutes les aires étudiées, avec une expression plus faible dans le cervelet) et le foie, moyennement exprimée dans les poumons et le cœur et faiblement exprimée dans les reins et les muscles squelettiques (Wang *et al.*, 2006).

#### 4.2.2 Expression de GABARAPL1 par immunohistochimie

D'autres laboratoires ont ensuite étudié l'expression de GABARAPL1 dans le cerveau de rat par immunohistochimie (Wang *et al.*, 2006). Les auteurs ont montré que GABARAPL1 est principalement détectée dans le putamen, le noyau accumbens, l'hypothalamus,

l'hippocampe et le thalamus et est moins exprimée dans la moëlle épinière, le pons, le bulbe olfactif et le cervelet. Au niveau cellulaire, l'anticorps a montré une expression ponctiforme de GABARAPL1 présente autour de l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique et dans les extensions dendritiques des neurones hypothalamiques de rat (Wang *et al.*, 2006). Un marquage ponctiforme de GABARAPL1 a également été observé dans des cellules cancéreuses de colon (HT29) soumises à des traitements induisant l'autophagie (Chiacchiera and Simone, 2009) ainsi que dans des cellules rénales de singe (COS M9) après surexpression de la protéine STBD1 (*starch binding domain-containing protein 1*) (Jiang *et al.*, 2010).

#### 4.2.3 Expression de protéines de fusion fluorescentes GABARAPL1

En raison des difficultés inhérentes à la détection des deux protéines GABARAP et GABARAPL1, plusieurs auteurs ont utilisé des protéines de fusion de GABARAPL1 qu'ils ont surexprimées dans leurs systèmes d'intérêts. Cette technique a permis de confirmer une localisation de la protéine recombinante GFP-GABARAPL1 au niveau du cytoplasme, de l'appareil de Golgi, du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique dans différents modèles cellulaires tels que des cellules de hamster (CHO), humaines (HeLa) et de singe (COS M9) ainsi que dans des cellules d'endomètre de cobaye (GEC) et des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) (*mouse embryonic fibroblasts*) (Mansuy *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Pankiv *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2008; Betin and Lane, 2009; Jiang *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2010).

## 5. Rôles de la protéine GABARAPL1

La découverte récente de plusieurs partenaires protéiques de GABARAPL1 a permis de décrire différents rôles pour cette protéine dans de nombreux processus cellulaires. A ce jour, il existe quatorze partenaires décrits de GABARAPL1, répartis principalement en deux groupes, sur la base de leurs implications dans le transport intracellulaire ou le processus d'autophagie (**Tableau 1**). Cependant, la plupart de ces partenaires connus interagissent également avec les autres membres de la famille ATG8, en particulier GABARAP et GABARAPL2, et ne sont donc pas spécifiques de GABARAPL1. Néanmoins, l'expression différentielle de ces protéines dans divers types cellulaires suggère que chaque protéine pourrait interagir de façon différente avec ces partenaires protéiques selon le tissu étudié.

Partenaires identifiés de GABARAPL1	GABARAP	GATE-16	LC3	Techniques démontrant l'interaction avec GABARAPL1	Fonctions potentielles ou avérées de l'interaction avec GABARAPL1	Références de l'interaction avec GABARAPL1
<b>Transport Intracellulaire</b>						
<b>Tubuline</b>	oui	ND	oui	GST pull-down ; surface plasmon resonance	transport intracellulaire de récepteurs	(Mansuy <i>et al.</i> , 2004; Chen <i>et al.</i> , 2006; Seguin-Py <i>et al.</i> , 2012)
<b>sous-unité <math>\gamma 2</math> du récepteur GABA<sub>A</sub></b>	oui	ND	ND	GST pull-down	transport intracellulaire du récepteur GABA <sub>A</sub>	(Mansuy <i>et al.</i> , 2004)
<b>PRIP1</b>	oui	ND	ND	GST pull-down	transport intracellulaire du récepteur GABA <sub>A</sub>	John Cashman, étudiant ERASMUS
<b>KOR</b>	oui	ND	ND	double-hybride ; GST pull-down ; immunoprécipitation	transport intracellulaire du récepteur KOR	(Chen <i>et al.</i> , 2006; Chen <i>et al.</i> , 2009)
<b>récepteur AT<sub>1</sub> à l'angiotensine II</b>	oui	ND	ND	double-hybride ; immunoprécipitation	transport intracellulaire du récepteur AT <sub>1</sub>	(Cook <i>et al.</i> , 2008)
<b>NSF</b>	oui	oui	ND	GST pull-down ; immunoprécipitation	transport de vésicules ; fusion membranaire	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
<b>ARH</b>	ND	ND	ND	double-hybride ; immunoprécipitation	endocytose médiée par la clathrine des récepteurs aux LDL ; croissance et élongation axonale	(Mameza <i>et al.</i> , 2007)
<b>PX-RICS</b>	oui	non	non	double-hybride ; GST pull-down ; immunoprécipitation	transport du complexe N-cadhérine/ $\beta$ -caténine	(Nakamura <i>et al.</i> , 2008)
<b>Autophagie</b>						
<b>p62</b>	oui	oui	oui	GST pull-down ; immunoprécipitation	dégradation de protéines ubiquitinylées par autophagie	(Rual <i>et al.</i> , 2005; Pankiv <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<b>NBR1</b>	oui	oui	oui	GST pull-down ; nuclear magnetic resonance titration ; ITC ( <i>isothermal titration calorimetry</i> )	dégradation de protéines ubiquitinylées par autophagie	(Kirkin <i>et al.</i> , 2009; Rozenknop <i>et al.</i> , 2011)
<b>NIX</b>	oui	oui	oui	double-hybride ; GST pull-down	élimination de mitochondries endommagées par mitophagie	(Novak <i>et al.</i> , 2010)
<b>STBD1</b>	oui	ND	ND	double-hybride ; immunoprécipitation	dégradation du glycogène par autophagie	(Jiang <i>et al.</i> , 2010)
<b>MAPK15/ERK8</b>	oui	ND	oui	double-hybride ; GST pull-down ; immunoprécipitation	induction de l'autophagie potentiellement par l'activité kinase de MAPK15/ERK8	(Colecchia <i>et al.</i> , 2012)

<i>Autres Fonctions</i>						
<b>GABARAPL1</b>	ND	ND	ND	GST pull-down ; surface plasmon résonance	ND	(Berthier, 2008)
<b>oligomères d'α-synucléine</b>	ND	ND	ND	puce à protéines	dégradation d'agrégats de protéines dans les maladies neurodégénératives	(Schnack <i>et al.</i> , 2008)
<b>DVL2</b>	oui	non	oui	double-hybride ; GST pull-down ; immunoprécipitation	dégradation de la protéine DVL2 pour réguler négativement la voie de signalisation WNT/β- catenin	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
<b>HSP90</b>	oui	oui	ND	GST pull-down ; immunoprécipitation	protection de GABARAPL1 de sa dégradation médiée par la protéasome	(Seguin-Py <i>et al.</i> , 2012)

**Tableau 1 : Partenaires protéiques de GABARAPL1 ainsi que leur interaction potentielle avec GABARAP et/ou GATE-16 et/ou LC3.** Les techniques ayant permis de mettre en évidence l'interaction avec GABARAPL1 ainsi que la fonction possible de l'interaction sont indiquées. ARH : *autosomal recessive hypercholesterolemia* ; DVL2 : *dishevelled 2* ; HSP90 : *heat shock protein 90* ; KOR : *κ opioid receptor* ; LDL : *low density lipoprotein* ; MAPK15/ERK8 : *mitogen-activated protein kinase 15/extracellular signal regulated kinase 8* ; NBR1 [*neighbour of BRCA1 (breast cancer 1)*] ; NSF : *N-ethylmaleimide-sensitive factor* ; PRIP1 : *phospholipase-C related catalytically inactive protein type 1* ; PX-RICS : *phox- rhoGAP involved in the β-catenin-N-cadherin and NMDA receptor signaling* ; GABAA : *gamma-aminobutyric acid type A receptor* ; STBD1 : *starch binding domain1* ; ND : non déterminé. D'après Seguin-Py (2012).

## 5.1 Rôle dans le transport des récepteurs

### 5.1.1 Le récepteur GABA<sub>A</sub>

La tubuline, une protéine structurelle des microtubules, est un constituant majeur du cytosquelette. Les microtubules sont composés de dimères de tubuline : l'α-tubuline et la β-tubuline. L'association de ces dimères participe à la polymérisation et à la dépolymérisation des microtubules mais peut également intervenir dans le transport de certaines protéines (de Forges *et al.*, 2012).

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont des canaux ioniques membranaires qui sont activés par la reconnaissance de leur ligand GABA<sub>A</sub> (*gamma-aminobutyric acid type A*), le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le cerveau. Suite à cette activation, le récepteur GABA<sub>A</sub> régule l'entrée d'ions chlorure dans les neurones, entraînant une hyperpolarisation et provoquant ainsi un effet inhibiteur sur la neurotransmission. Ces récepteurs jouent un rôle dans diverses conditions physiologiques telles que l'anxiété, les rythmes circadiens, la cognition, l'apprentissage, la mémoire et la vigilance (Michels and Moss, 2007). Le récepteur GABA<sub>A</sub> est formé de cinq sous-unités polypeptidiques (α, β, γ, δ et ρ) synthétisées au niveau

du réticulum endoplasmique et transportées jusqu'à l'appareil de Golgi. Les canaux ioniques formés sont ensuite transportés à la membrane plasmique où ils peuvent exercer leurs fonctions. Cette dernière étape est dépendante de la présence de la sous-unité  $\gamma 2$  (Essrich et al., 1998).

En 1999, Wang et collègues ont démontré que la protéine GABARAP interagit avec la tubuline et avec la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> (Wang *et al.*, 1999). Au laboratoire, il a été démontré, par des expériences de GST-pulldown, à partir d'extraits de cerveau de rat et de résonance plasmonique de surface, que la protéine GABARAPL1 interagit également avec la tubuline et la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> (Mansuy *et al.*, 2004). De plus, l'utilisation d'un mutant de GABARAPL1 a permis de montrer que les 22 premiers acides aminés sont nécessaires pour cette interaction (Mansuy-Schlick et al., 2006). Des expériences de turbidimétrie ont également démontré que GABARAPL1 favorise la polymérisation de la tubuline pour former des microtubules, suggérant que cette protéine peut également interagir avec les microtubules (Mansuy *et al.*, 2004).

Bien que la pertinence fonctionnelle de l'interaction de GABARAPL1 avec la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> n'ait pas encore été confirmée, nous pouvons avancer des hypothèses sur sa fonction basées sur les données disponibles concernant la protéine GABARAP. Suite à l'identification de l'interaction de GABARAP avec la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub>, Wang et collègues ont démontré que cette interaction est dépendante des acides aminés 36 à 68 (Wang *et al.*, 1999). D'autres études ont également démontré que la surexpression de la protéine de fusion YFP-GABARAP dans les cellules COS7 ou des cultures de neurones d'hippocampe conduit à une augmentation du nombre de récepteurs GABA<sub>A</sub> à la surface de la membrane plasmique, étape qui est dépendante d'une interaction entre GABARAP et le récepteur (Leil et al., 2004). Par ailleurs, Chen et collègues ont démontré que le clivage protéolytique de la protéine GABARAP en aval de son résidu glycine 116 est nécessaire pour sa fonction dans le transport du récepteur GABA<sub>A</sub> (Chen et al., 2007). Finalement, GABARAP interagit avec la protéine PRIP1 (*phospholipase C-related inactive protein 1*) et cette interaction facilite son rôle dans le transport du récepteur GABA<sub>A</sub> (Mizokami et al., 2007). Une étude similaire effectuée par GST-pulldown dans notre équipe a également montré une interaction directe entre la protéine GABARAPL1 et PRIP. Tous ces résultats suggèrent donc que GABARAPL1 pourrait former un complexe avec la tubuline,

PRIP et la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> pour permettre le transport du récepteur vers la membrane plasmique grâce à son interaction avec les microtubules.

### 5.1.2 Le récepteur aux $\kappa$ -opioïdes

Le récepteur aux  $\kappa$ -opioïdes ( *$\kappa$  opioid receptor*, KOR) appartient à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G (*G protein-coupled receptors*, GPCR) et à la sous-famille des récepteurs aux rhodopsines (Law et al., 2000). Les KOR, comportant sept segments transmembranaires, sont activés à la suite de la reconnaissance de composés opiacés, telles que les dynorphines, et exercent leurs effets *via* de nombreux effecteurs tels que l'adénylate cyclase, les canaux calciques, la phospholipase C et les canaux à potassium (Law et al., 2000). Ces récepteurs sont largement distribués dans le SNC où ils interviennent au cours de différents processus physiologiques tels que l'antinociception, la diurèse et la mémorisation (VonVoigtlander et al., 1983; Pfeiffer et al., 1986; Dykstra et al., 1987).

L'interaction de GABARAPL1 avec le KOR a été identifiée par la technique de double-hybride chez la levure, puis confirmée *in vitro* par GST-pulldown et par immunoprécipitation à partir de cellules CHO (Chen et al., 2006). Les expériences de double-hybride ont démontré que trois résidus (F<sup>345</sup>, P<sup>346</sup> et M<sup>350</sup>) du KOR et sept résidus (Y<sup>49</sup>, V<sup>51</sup>, L<sup>55</sup>, T<sup>56</sup>, V<sup>57</sup>, F<sup>60</sup> et I<sup>64</sup>) de GABARAPL1 étaient indispensables pour l'interaction entre ces deux protéines (Chen et al., 2009). Par ailleurs, la surexpression de GABARAP, GABARAPL1 ou GABARAPL2 augmente le nombre de KOR présents à la surface de la membrane plasmique mais GABARAP et GABARAPL2 entraînent une relocalisation moins importante du récepteur que celle observée avec GABARAPL1 (Chen et al., 2009; Chen et al., 2011). Ce qui est plus intéressant est le fait que la maturation de GABARAP au niveau de la glycine 116 est nécessaire pour son rôle dans le transport des KOR mais ne l'est pas pour GABARAPL1 (Chen et al., 2011). De plus, des expériences de GST-pulldown ont démontré que l'interaction entre GABARAP et le KOR est plus faible que celle entre GABARAPL1 et KOR. De ce fait, les auteurs ont suggéré que la protéine GABARAP requiert une étape de maturation qui est nécessaire pour augmenter son affinité pour le récepteur. En revanche, la forte interaction entre GABARAPL1 et KOR semble être suffisante pour le recrutement et le transport du récepteur à la surface de la cellule. Ces données sont d'autant plus intéressantes que la maturation des deux protéines est par contre nécessaire pour leur conjugaison à des phospholipides et leur rôle au cours de l'autophagie comme décrit ultérieurement.

GABARAPL1 interagit également avec la protéine NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), une ATPase cytoplasmique impliquée dans le transport de plusieurs récepteurs et dans le processus de fusion membranaire (Hanson et al., 1997; Robinson et al., 1997). Cette interaction a été démontrée par GST-pulldown dans des cellules CHO et confirmée par immunoprécipitation à partir d'extraits de cerveau de rat (Chen *et al.*, 2006). GABARAP et GABARAPL2 ont également été décrites comme des partenaires protéiques de NSF et un site de liaison potentiel à NSF a été identifié pour ces deux protéines (Goto et al., 2005). La protéine NSF étant également impliquée dans le transport des récepteurs à glutamate de type AMPA (*alpha-amino-3hydroxy-5methyl-4-isoxazole-propionic acid*) et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Rothman, 1994; McDonald et al., 1999), cela suggère que GABARAPL1 pourrait être impliquée dans le transport intracellulaire de récepteurs neuronaux autres que les récepteurs GABA<sub>A</sub>R et KOR.

#### 5.1.3 Les récepteurs AMPA et EP3.f

Le récepteur EP3.f (*prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP3 subtype*) est, comme le KOR, apparenté à la super-famille des GPCR et est activé par liaison de son ligand, la prostaglandine E<sub>2</sub> (Bilson et al., 2004). Le récepteur AMPA, en revanche, appartient à la famille des récepteurs glutaminergiques qui sont responsables de la transmission synaptique excitatrice dans le cerveau (Anggono and Huganir, 2012). Comme pour le KOR, la surexpression de GABARAPL1 dans des cellules CHO augmente le nombre de ces deux récepteurs à la surface de la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2009). Les auteurs ont proposé que la sous-unité GluR1 (*glutamate receptor type 1*) du récepteur AMPA et le récepteur EP3.f pourraient interagir avec la protéine GABARAPL1 grâce à leurs motifs FPXXM et FPXM, similaires à celui présent dans la protéine KOR.

#### 5.1.4 Le récepteur AT1

Le récepteur AT1 (*angiotensin receptor type 1*), activé par l'angiotensine, est également apparenté à la super-famille des GPCR. Il est, avec AT2, un de deux récepteurs de l'angiotensine. Ce récepteur joue un rôle central dans le système rénine-angiotensine, qui est lui-même un important régulateur de la pression artérielle, de l'équilibre électrolytique et de la sécrétion d'aldostérone et de vasopressine (Jagadeesh, 1998).

Il a été montré que la surexpression de GABARAP dans des cellules PC12 conduit à une augmentation du taux d'expression du récepteur AT1 dans la cellule ainsi qu'à une



augmentation de son transport à la surface de la membrane plasmique (Cook *et al.*, 2008). De plus, une deuxième étude a démontré que le processus de maturation de la partie N-terminale de GABARAP n'était pas nécessaire pour obtenir ce phénotype (Alam *et al.*, 2010). Alors que GABARAPL1 interagit également avec le récepteur AT1 (Cook *et al.*, 2008), les auteurs n'ont pas étudié le rôle de GABARAPL1 sur les niveaux d'expression de cette protéine.

### 5.2 Autres rôles dans le transport

Récemment, un nouveau rôle de transport a été mis en évidence pour la protéine GABARAPL1 : une interaction entre GABARAPL1 et la protéine ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia*) dans le cerveau murin. Dans cette étude, il a été également décrit une expression axonale des ARNm *gabrarpl1* et *arh* (Mameza *et al.*, 2007). La protéine ARH est impliquée dans l'endocytose des récepteurs aux LDL (*low density lipoprotein*) médiée par la clathrine (Jones *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent donc que GABARAPL1 pourrait interagir avec ARH pour participer à l'endocytose et au transport des récepteurs aux LDL et, par conséquent, réguler le métabolisme des lipoprotéines dans le cerveau.

Un autre rôle de GABARAPL1 dans le métabolisme du glycogène a été récemment mis en évidence. Il a été montré que GABARAPL1 interagit avec la protéine STBD1 (*starch binding domain-containing protein 1*) qui est fortement exprimée dans le foie et le muscle, où le glycogène est stocké comme réserve d'énergie. Il a été montré que STBD1 peut s'associer au glycogène (Stapleton *et al.*, 2010) et avec les protéines GABARAP et GABARAPL1 dans des cellules COS M9 (Jiang *et al.*, 2010) afin de cibler le glycogène vers les lysosomes pour induire son hydrolyse et le recyclage des oses. Ce mécanisme, qui est lié au processus autophagique, a été baptisé glycophagie. Cette interaction est dépendante d'un motif AIM (*ATG8 interacting motif*) identifié dans la protéine STBD1.

### 5.3 Rôle au cours de l'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique au cours duquel les constituants de la cellule sont englobés par l'autophagosome et dégradés par les lysosomes. Le processus d'autophagie nécessite l'intervention de plus de 30 protéines appelées *atg* dont les rôles seront décrits plus amplement ultérieurement. Parmi ces protéines, ATG8, et donc ses homologues chez les mammifères, interviennent au cours de la formation de l'autophagosome. Au cours de l'autophagie, LC3B, qui est l'homologue ATG8 le plus étudié,

est clivé puis conjugué à des phospholipides au niveau de la membrane de l'autophagosome. Ce clivage est effectué par la cystéine protéase, ATG4B, qui conduit alors à l'exposition du résidu glycine en position 116 C-terminale de LC3B pour donner la forme mature soluble (-I) de cette protéine. Cette protéine mature est ensuite conjuguée à un phospholipide, généralement un phosphatidyléthanolamine (PE), grâce aux enzymes ATG7 et ATG3 et le complexe ATG12/ATG5/ATG16L pour donner la forme conjuguée (-II). Finalement, LC3B est, soit dégradée par les lysosomes, soit recyclée par délipidation sous l'action de la protéine ATG4B (Geng and Klionsky, 2008). Un tel mécanisme a également été décrit pour les protéines GABARAP et GABARAPL2 (Tanida et al., 2001; Hemelaar et al., 2003; Tanida et al., 2003; Kabeya et al., 2004).

Alors qu'un rôle pour GABARAPL1 dans ce processus a été fortement suggéré, il n'a été que récemment confirmé dans notre équipe (Chakrama et al., 2010). En effet, il a été démontré que GABARAPL1 est clivée au niveau de sa glycine 116 par la protéase ATG4B pour donner la forme mature de la protéine (-I) puis qu'elle est conjuguée à un phospholipide pour donner la forme (-II). Finalement, il a été démontré que GABARAPL1 est localisée au niveau des vésicules autophagiques et que cette localisation est dépendante du processus d'autophagie. L'ensemble de ces résultats a permis de démontrer le rôle de GABARAPL1 au cours de l'autophagie et de l'identifier comme un nouveau marqueur de ce processus. Par ailleurs, une autre étude ayant pour but de caractériser le réseau des protéines intervenant au cours de l'autophagie a suggéré de nombreux partenaires de GABARAPL1 au cours de l'autophagie tels que ATG4B, GABARAPL2, NEDD4 et FYCO1 (Behrends et al., 2010).

Bien que l'autophagie soit souvent considérée comme un processus non-sélectif, plusieurs études récentes ont établi une relative sélectivité de ce mécanisme. Cette spécificité est notamment apportée par les protéines adaptatrices, qui sont les protéines permettant le lien entre le cargo qui doit être dégradé (agrégats de protéines, organites ou autres molécules) et les protéines ATG8 au niveau de la membrane autophagosomale. Ce processus est appelé autophagie sélective et sera également détaillé dans le chapitre suivant. Le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie sélective a été démontré récemment dans une étude montrant l'importance de cette protéine dans la dégradation sélective des mitochondries par autophagie, la mitophagie. Ce mécanisme requiert la protéine adaptatrice

NIX (Novak *et al.*, 2010). L'importance des interactions adaptateurs/protéines ATG8 sera discutée plus amplement dans le chapitre suivant.

L'interaction entre GABARAPL1 et les protéines impliquées dans le processus d'autophagie suggère un rôle important de GABARAPL1 dans ce processus et en particulier dans le processus de sélection du cargo qui doit être dégradé.

#### 5.4 Rôle dans la prolifération cellulaire et le cancer

Finalelement, quelques études récentes suggèrent un rôle de la protéine GABARAPL1 en tant que molécule suppresseur de tumeur.

Comme mentionné précédemment, le gène *gabarapl1* est peu ou pas exprimé dans les cellules cancéreuses. De plus, l'expression de son transcrit a été associée à une diminution du risque de récurrence chez des patientes atteintes de cancer de sein. Il a également été montré que la surexpression de la protéine FLAG-GABARAPL1-6HIS inhibe la prolifération de cellules de cancer du sein, MCF-7 (*Michigan cancer foundation-7*) et conduit à une diminution de la croissance des cellules en agar mou (Berthier *et al.*, 2010; Seguin-Py, 2011). L'inhibition de la prolifération cellulaire après surexpression de la protéine GABARAPL1 dans les cellules MCF-7 a été confirmée *in vitro* par une autre équipe (Zhang *et al.*, 2011). Cette équipe a également montré que GABARAPL1 peut interagir avec la protéine DVL2 (*dishevelled 2*) pour conduire celle-ci vers les autophagosomes pour y être dégradée, ce qui inhibe la voie de signalisation WNT (*wingless-integration 1 pathway*) et la prolifération cellulaire. De plus, les auteurs ont montré que des cellules MCF-7 qui surexpriment la protéine HA-GABARAPL1 conduisent à la formation de tumeurs de tailles réduites dans des souris nude comparativement aux cellules MCF-7 sauvages. L'ensemble de ces données démontre que le gène *gabarapl1* est un gène de suppresseur de tumeurs dans les cancers du sein.

## II Autophagie

### 1. Historique

Il existe deux voies majeures de dégradation des constituants cellulaires dans le cytoplasme: le protéasome et l'autophagie. Le protéasome est principalement impliqué lors de la dégradation de petites protéines ubiquitinylées à durée de vie courte (Dalton, 2004).

En revanche, l'autophagie (du grec « se manger soi-même ») est un processus catabolique responsable de la dégradation et du recyclage de différents constituants du cytoplasme comme les protéines à longue vie, les agrégats de protéines et les organites.

L'inclusion d'organites et de mitochondries dans des vacuoles à doubles membranes a été observée par microscopie électronique pour la première fois en 1957 dans des reins de souris (Clark, 1957) et en 1962 dans le foie (Ashford and Porter, 1962). La présence d'enzymes lysosomales dans ces vacuoles a également été décrite après incubation avec un milieu spécifique pour les phosphatases acides et la mesure de leur activité enzymatique (Novikoff, 1959; Novikoff and Essner, 1962). Le terme « autophagie » a, quant à lui, été introduit pour la première fois en 1963 par Christian de Duve, découvreur du lysosome, lors du premier symposium international sur les lysosomes (de Reuck AVS, 1963; Klionsky, 2008). Ces premières expériences comprenaient une analyse morphologique des autophagosomes ou des lysosomes (par microscopie électronique) et une analyse du flux autophagique (par étude de la capacité des autophagosomes à capturer des oses radiomarqués et à les délivrer aux lysosomes) (Deter and De Duve, 1967; Schimke, 1970). Le groupe de Ohsumi a démontré plus tard l'existence de vésicules autophagiques, similaires à celles décrites chez l'homme, chez la levure, (Takeshige et al., 1992) mais ce n'est qu'en 1997 que le premier gène de l'autophagie, *atg1*, a été découvert chez la levure. Cette découverte a été suivie un an plus tard par l'identification des premiers homologues des gènes *atg* chez les mammifères (Matsuura et al., 1997; Mizushima et al., 1998).

On sait maintenant que l'autophagie est un processus conservé au cours de l'évolution de la levure aux mammifères en passant par les cellules végétales (Klionsky and Emr, 2000). Ce processus est induit par de nombreux stimuli extracellulaires comme la carence en nutriments ou en acides aminés, l'hypoxie, l'infection par des bactéries ou des virus mais peut également être dû à une accumulation d'organites ou de protéines endommagées (Kroemer et al., 2010). Bien que son rôle exact dans la cellule saine et dans certaines pathologies fasse toujours l'objet de nombreuses études, on sait que l'autophagie est impliquée dans des processus cellulaires tels que la différenciation, la mort cellulaire et le vieillissement mais aussi dans différentes pathologies telles que le cancer, la maladie de Huntington, d'Alzheimer et de Parkinson (Rosello et al., 2012).

## 2. Formes d'Autophagie

L'autophagie est un terme général qui décrit les différentes formes de dégradation des protéines et des organites par les enzymes lysosomales. Il existe trois types d'autophagie : l'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA, pour *chaperone-mediated autophagy*), la microautophagie et la macroautophagie (Figure 6).

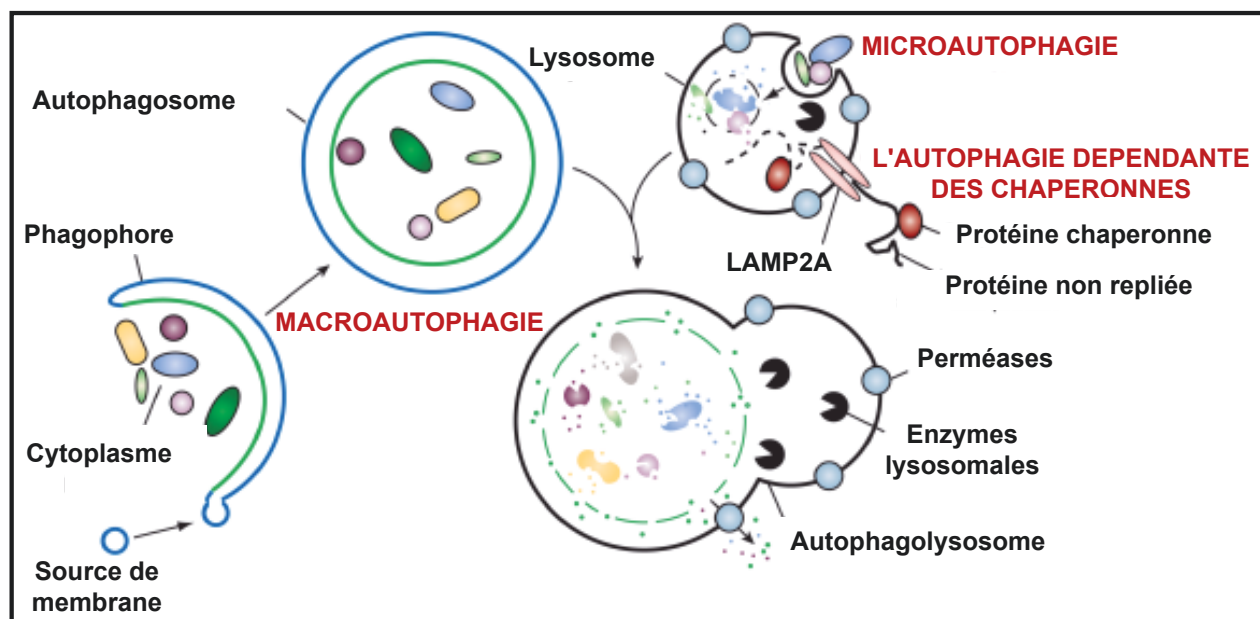


Figure 6 : Schéma décrivant les trois formes principales de l'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie dépendante des chaperonnes. D'après Mizushima *et al.* (2008).

### 2.1 L'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA)

La CMA est un processus de dégradation des protéines observé uniquement dans les cellules de mammifères. Ce processus peut être induit de manière tardive par une carence en nutriments (au moins 10 heures de carence) (Backer and Dice, 1986; Cuervo *et al.*, 1995), par le stress oxydatif (Kiffin *et al.*, 2004; Finn and Dice, 2005) et également après exposition à un composé toxique qui dénature les protéines cytosoliques comme le TMP (2,2,4-triméthylpentane) (Cuervo *et al.*, 1999). Elle joue un rôle dans plusieurs processus physiologiques comme le vieillissement (Dice, 1982; Cuervo and Dice, 2000; Cuervo *et al.*, 2004), les maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer)

(Cuervo *et al.*, 2004; Martinez-Vicente *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), les néphropathies (Cuervo *et al.*, 1999; Sooparb *et al.*, 2004) et le cancer (Kon *et al.*, 2011; Saha, 2012).

La CMA est plus sélective que les deux autres formes d'autophagie dans le sens où elle dégrade uniquement les protéines contenant une séquence signal pentapeptidique KFERQ. Cette séquence permet la reconnaissance de la protéine à dégrader par une protéine chaperonne qui aide à la dénaturation et au transport de la protéine cible vers le récepteur lysosomal. Celle-ci est alors transportée à travers la membrane pour être dégradée par les enzymes lysosomales. Alors que le terme CMA a été proposé en 2000 par Anna-Maria Cuervo (Cuervo and Dice, 2000), le concept selon lequel certaines protéines peuvent être spécifiquement et directement dégradées par le lysosome sans passage au sein d'une vésicule a été initialement proposé par Fred Dice en 1978 lors d'études du taux de dégradation lysosomale chez les rats diabétiques (Dice *et al.*, 1978). Dix ans plus tard, le motif pentapeptidique KFERQ, qui permet le ciblage de protéines aux lysosomes pour leur dégradation, a été identifié (Chiang and Dice, 1988). Les protéines présentant ce motif sont reconnues par la protéine chaperonne HSC70 (*heat shock cognate 70*) (Chiang *et al.*, 1989) qui les conduit vers le lysosome où elles interagissent avec le récepteur lysosomal transmembranaire appelé LAMP2A (*lysosome-associated membrane protein type 2A*) (Cuervo and Dice, 1996). Une forme lysosomale de HSC70, qui joue un rôle lors du transport de la protéine à travers la membrane lysosomale, a également été décrite (Agarraberes *et al.*, 1997). Ce processus nécessite la dénaturation des protéines cibles (Salvador *et al.*, 2000). Pour cela, HSC70 cytosolique est aidée par des co-chaperones (HSP40, HSP90, HIP, HOP et BAG-1) dont certaines sont nécessaires pour le transport des substrats protéiques à travers la membrane lysosomale (Agarraberes and Dice, 2001). Au niveau du lysosome, l'interaction entre le substrat et le récepteur LAMP2A monomérique permet la dimérisation du récepteur grâce à la protéine HSP90 lysosomale pour former un complexe-multimérique (Cuervo and Dice, 2000; Bandyopadhyay *et al.*, 2008). La protéine LAMP2A semble être le facteur limitant dans la CMA car les niveaux de LAMP2A dans un modèle de surexpression sont directement corrélés avec l'activité de dégradation par la CMA.

## 2.2 La microautophagie

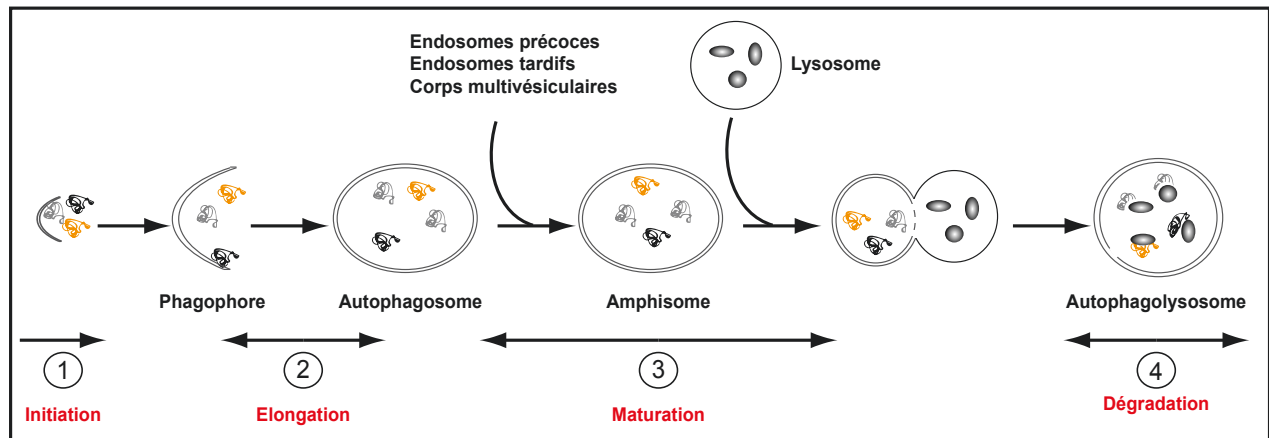
Contrairement à la CMA, la microautophagie est considérée comme un processus de dégradation non spécifique des organites ou des protéines. Le terme microautophagie a été

initialement proposé en 1966 (De Duve and Wattiaux, 1966). Depuis, la majorité des expériences sur le sujet a été conduite sur des modèles de levures.

Durant ce processus, la membrane lysosomale va se déformer et absorber des constituants du cytoplasme (Li et al., 2012). La microautophagie peut être sélective et participer à la dégradation spécifique d'un organe. On peut citer la micromitophagie (dégradation spécifique des mitochondries), la micronucléophagie (dégradation spécifique d'une partie du noyau, observée seulement chez la levure) ou la micropexophagie (dégradation spécifique des peroxysomes) (Mijaljica et al., 2011). Le mécanisme moléculaire de ces différents types de microautophagie chez la levure n'est pas encore complètement élucidé. De plus, pour le moment, ce mécanisme n'a pas été mis en évidence chez les mammifères. Récemment, il a été suggéré que la microautophagie pourrait jouer un rôle compensatoire, avec la CMA, dans les cellules déficientes en macroautophagie (Sou et al., 2008).

### 2.3 La macroautophagie

La macroautophagie correspond à la formation *de novo* d'une vacuole à doubles membranes, appelée vacuole autophagique ou autophagosome, qui fusionne ensuite avec les lysosomes pour aboutir à la dégradation de sa membrane interne et de ses constituants par les enzymes lysosomales (**Figure 7**). La macroautophagie, appelée aussi autophagie, est le processus canonique de l'autophagie et constitue le principal mécanisme de la dégradation des protéines et des organites dans les cellules et c'est celui auquel nous nous intéresserons dans le reste de ce manuscrit.



**Figure 7: Le mécanisme général de la macroautophagie.** (1) L'initiation implique la séquestration du matériel à dégrader par des doubles membranes appelées phagophores. (2) L'élongation et la fermeture du phagophore donnent naissance à l'autophagosome. (3) L'autophagosome subit un processus de maturation où il fusionne d'abord avec des constituants du système endomembranaire, tels que les endosomes précoces et tardifs ou les corps multivésiculaires, pour donner l'amphisome et ensuite avec les lysosomes pour donner l'autophagolysosome. (4) Les constituants de l'autophagosome sont alors dégradés par les enzymes lysosomales. D'après Maiuri *et al.* (2007).

### 3. Mécanisme Moléculaire de la Macroautophagie

Le processus d'autophagie fait intervenir différentes étapes : (1) l'induction de la formation d'une structure à doubles membranes, appelée phagophore, et séquestration de protéines et organites, (2) l'élongation du phagophore pour former un autophagosome, (3) la maturation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome pour former l'autophagolysosome et finalement, (4) la dégradation de la membrane interne ainsi que du contenu de l'autophagosome par les enzymes lysosomales. Les protéines impliquées dans ces différentes étapes du processus autophagique sont appelées protéines ATG (Klionsky *et al.*, 2003) et sont classées en cinq groupes (**Figure 8**) : (1) le complexe ATG1/ULK1, (2) le complexe PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*) de classe III, (3) la protéine transmembranaire ATG9, (4) le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16 et, (5) le système de conjugaison ATG8/LC3-PE (Suzuki *et al.*, 2007). Une description détaillée des différents mécanismes d'action de ces complexes dans les cellules de mammifères est donnée dans les chapitres suivants.



### 3.1 Induction/Nucléation

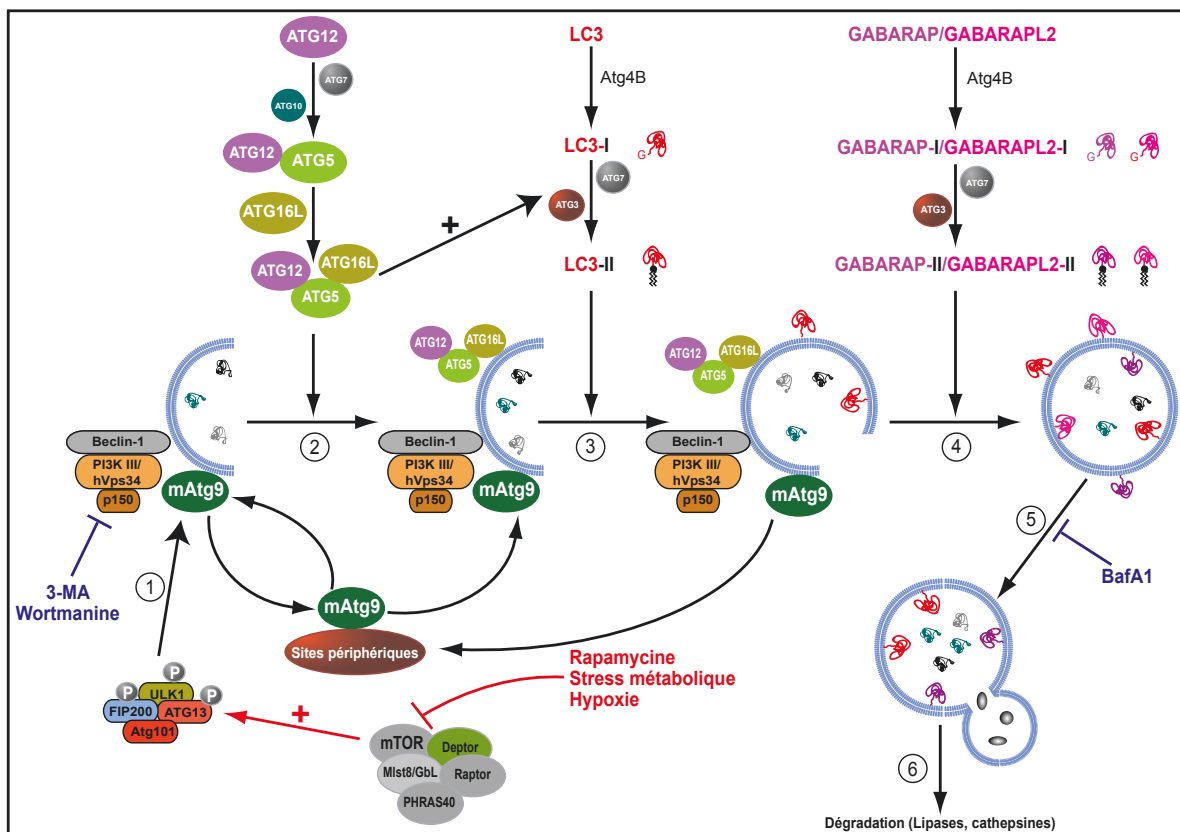
L'autophagie est présente à un niveau basal dans tous les tissus afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie peut aussi être induite par de nombreux stress tels que la carence en acides aminés ou en nutriments, l'hypoxie, le stress oxydatif ou l'infection par des pathogènes tels que des virus (Kroemer *et al.*, 2010).

L'activation de l'autophagie chez la levure et les cellules de mammifères suite à une privation de nutriments passe par la régulation d'une sérine/thréonine kinase appelée TOR (*target of rapamycin*) chez la levure et mTOR (*mammalian TOR*) chez les mammifères. Dans la cellule, la forme active phosphorylée de mTOR régule négativement l'autophagie *via* la phosphorylation de ces substrats tels que ATG13. L'inactivation de mTOR par déphosphorylation induit l'autophagie par la régulation transcriptionnelle de gènes autophagiques, tels que *atg8* et *ape1* (*aminopeptidase 1*) chez la levure, et l'induction de la formation des autophagosomes (Abeliovich *et al.*, 2000).

Chez les mammifères, mTOR est présente au niveau de deux complexes distincts :

- le complexe mTORC1, dans lequel on retrouve les protéines mLST8 (*mTOR associated protein, mammalian LST8 homolog*), RAPTOR (*regulatory associated protein of mTOR*), DEPTOR (*DEP-domain-containing and mTOR-interactive protein*), PRAS40 (*proline-rich akt substrate of 40 kDa*) et mTOR ;
- le complexe mTORC2, dans lequel on retrouve les protéines mSIN1 (*mammalian stress-activated MAP kinase-interacting protein 1*), mLST8, RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), DEPTOR et mTOR.

Néanmoins, c'est le complexe mTORC1 qui joue un rôle majeur dans la régulation de l'autophagie et qui peut être inhibé par l'inducteur de l'autophagie, la rapamycine (Loewith *et al.*, 2002).



**Figure 8 : Mécanisme détaillé de la macroautophagie.** La macroautophagie est induite par de nombreux stress tels que le stress métabolique ou l'hypoxie ou par des composants inhibant le complexe mTOR tel que la Rapamycine. **(1)** L'inhibition du complexe mTOR libère le complexe ULK1 et induit la macroautophagie. **(2)** Le complexe PI3 kinase de classe III et la protéine mAtg9 sont recrutés précocement au niveau du site d'assemblage des phagophores (PAS) pour augmenter les niveaux de PI3P par synthèse *de novo* ou par transport de lipides lors de la formation des autophagosomes. **(3)** L'élongation de l'autophagosome est caractérisée par la formation du complexe Atg5-Atg12-Atg16L qui aide au recrutement des protéines LC3 et GABARAP au niveau des membranes autophagosomales. **(4)** Les protéines de la sous-famille GABARAP sont nécessaires pour la fermeture de la membrane autophagosomale. Seules les protéines des sous-familles LC3 et GABARAP restent associées à la membrane autophagosomale. **(5)** L'autophagosome fusionne avec les endosomes et ensuite les lysosomes. **(6)** Les constituants autophagosomaux ainsi que la membrane interne de l'autophagosome sont dégradés par les enzymes lysosomales. Les inducteurs de la macroautophagie sont indiqués en rouge et les inhibiteurs sont indiqués en bleu. D'après Chakrama (2011).

### 3.1.1 Complexe ATG1/ULK1

Le complexe mTORC1 régule négativement l'autophagie par l'intermédiaire de ses cibles en aval : les complexes ULK1 et ULK2 qui comprennent l'homologue de la protéine de la levure ATG1, ULK1/2 (*unc51-like kinase 1 et 2*) (Yan et al., 1998; Yan et al., 1999), mATG13 (*mammalian atg13*) (Chan et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009), l'orthologue chez les mammifères d'ATG17, FIP200 (*focal adhesion kinase-family-interacting protein of 200 kDa*) (Hara et al. 2008) et ATG101 (Hosokawa et al., 2009; Mercer et al., 2009). Ces

complexes sont formés de façon constitutive dans la cellule mais leur activation dépendra de leur phosphorylation ultérieure (Hara et al., 2008; Hosokawa *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009). Quand mTOR est activée, elle se lie aux protéines ULK1/2 et mATG13 et contrôle leur état de phosphorylation. Lors d'une carence en nutriments, mTORC1 se dissocie de ce complexe, ce qui provoque la déphosphorylation d'ULK1/2. Sous sa forme libre, ULK1/2 va s'autophosphoryler et va induire la phosphorylation de mATG13 et FIP200 (Hosokawa *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2009).

Bien que la fonction de ULK2 reste floue, le rôle de ULK1 dans la régulation de l'autophagie est clairement démontré (Young et al., 2006; Chan et al., 2007; Hara *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009). Le complexe ULK1 est principalement détecté dans le cytosol et s'associe aux phagophores durant les stades précoces de sa formation (Hara *et al.*, 2008). Chacun des quatre composants protéiques de ce complexe est essentiel pour la formation des autophagosomes (Chan *et al.*, 2007; Hara *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009; Ganley et al., 2009; Hosokawa *et al.*, 2009; Hosokawa *et al.*, 2009; Mercer *et al.*, 2009). Chez la levure, le complexe ATG1 recrute d'autres protéines ATG nécessaires pour l'autophagie tels que ATG2 et ATG18 (Obara et al., 2006; Suzuki *et al.*, 2007). Par ailleurs, ATG1 chez la levure peut s'associer avec ATG14, un composant du complexe PI3 kinase de classe III (Obara *et al.*, 2006), suggérant que le complexe ULK1 chez les mammifères pourrait aussi interagir avec le complexe PI3 kinase de class III (Obara *et al.*, 2006).

### 3.1.2 Complexe PI3 kinase de classe III

Il existe chez les mammifères deux classes de PI3K : I et III. Les membres de la classe I sont impliqués dans la régulation négative de l'autophagie à travers une cascade de signalisation débutant au niveau de la membrane plasmique et induite par l'insuline qui active ensuite mTOR et la PKB (protéine kinase B) (Yang and Klionsky, 2009). Le complexe PI3 kinase de classe III, en revanche, est essentiel à l'induction de l'autophagie (Marino and Lopez-Otin, 2004). Les protéines faisant partie de ce complexe sont : la PI3 kinase de classe III, VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*) ; l'homologue d'ATG6, BECLIN1 (*coiled-coil, moesin-like Bcl-2 interacting protein 1*) et l'homologue de VPS15, p150 (*PI3-kinase p150 subunit*) (Sun et al., 2009). Dans ce complexe, BECLIN1 se lie avec VPS34 pour l'activer et, par conséquent, augmenter les niveaux de PI3P (*phosphatidylinositol 3-phosphate*), un processus requis pour l'autophagie (Zeng et al., 2006; Funderburk et al., 2010).

Le mécanisme détaillé par lequel ce complexe régule l'induction de l'autophagie n'est pas encore complètement élucidé. De plus, il semble que ce complexe puisse jouer plusieurs rôles, dépendant du type de protéines recrutées par BECLIN1 (Proikas-Cezanne and Codogno, 2011). BECLIN1 peut en effet recruter des protéines inhibitrices ou activatrices de la régulation de l'activité du complexe PI3K de classe III. Quand BECLIN1 est associée avec ATG14L (*autophagy-related protein 14-Like protein* aussi appelée BARKOR pour *beclin1-associated autophagy-related key regulator*), le complexe I des PI3 kinases est formé et il se localise au niveau du phagophore. ATG14L peut ensuite stimuler l'activité kinase de VPS34 pour favoriser la formation de l'autophagosome (Itakura et al., 2008; Sun et al., 2008; Matsunaga et al., 2009). BECLIN1 peut aussi interagir avec la protéine UVRAG (*ultraviolet irradiation resistance-associated gene*, l'homologue de Vsp38) pour former le complexe III des PI3 kinases, qui intervient lors de la maturation des autophagosomes (voir section 3.3). ATG14L et UVRAG entrent donc en compétition pour interagir avec BECLIN1. Cette protéine peut donc réguler l'initiation de l'autophagie en modifiant la composition des sous-unités du complexe PI3K de classe III (Itakura et al., 2008; Sun et al., 2008).

BECLIN1 peut également interagir avec d'autres protéines telle que AMBRA1 (*activating molecule in beclin1-regulated autophagy 1*), un régulateur positif de l'autophagie et du développement du système nerveux (Fimia et al., 2007). BECLIN1 interagit aussi, par l'intermédiaire d'UVRAG, avec BIF-1 (*BAX-interacting factor 1*) pour activer l'autophagie (Takahashi et al., 2007). Finalement, BECLIN1 peut interagir avec deux protéines anti-apoptotiques, BCL-2 (*β cell lymphomas 2*) et BCL-xL (*β cell lymphomas-extra large*), et cette interaction perturbe l'interaction entre BECLIN1 et le complexe PI3 kinase inhibant ainsi l'autophagie (Pattingre et al., 2005; He and Levine, 2010).

### 3.1.3 ATG9

ATG9 est la seule protéine ATG transmembranaire (Reggiori, 2006). Il existe deux orthologues de la protéine ATG9 chez les mammifères : ATG9L1, aussi appelée mATG9 et exprimée de manière ubiquitaire, et ATG9L2, exprimée uniquement dans le placenta et l'hypophyse (Yamada et al., 2005; Young et al., 2006). Parmi ces deux protéines, seule mATG9 (ATG9L1) est essentielle au processus d'autophagie. En effet, l'extinction de son expression dans les cellules HEK293 par siRNA inhibe la conjugaison de LC3 aux phospholipides et la dégradation de protéines. De plus, les souris invalidées pour le gène *atg9* présentent une diminution du nombre d'autophagosomes exprimant LC3 et meurent

immédiatement après leur naissance suite à une carence en nutriments (Yamada *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2009).

mATG9 est une protéine comprenant six domaines transmembranaires avec ses deux extrémités présentes du côté cytosolique. Elle se localise au niveau de l'appareil de Golgi et des endosomes tardifs. En condition de carence en nutriments, mATG9 co-localise avec LC3 sur les autophagosomes et cette co-localisation est dépendante d'ULK1, mATG13 et VPS34 (Young *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2009). Chez la levure, ATG9 se dissocie de l'autophagosome avant sa fermeture pour être recyclée. L'association et la dissociation d'ATG9 avec l'autophagosome est dépendante non seulement des complexes ATG1 et VPS34 mais aussi de ATG18 et ATG2, dont le recrutement au niveau de la structure pré-autophagosomale est nécessaire pour le recyclage d'ATG9 (Reggiori *et al.*, 2004). Un rôle pour les homologues d'ATG18 (WIPI, *w*d-repeat protein *i*nteracting with *p*hospho*i*nositides) et d'ATG2 (ATG2A/B) chez les mammifères dans le recyclage de mATG9 n'a pas encore été identifié.

La fonction précise de mATG9 au cours de l'autophagie n'est pas encore connue mais certains auteurs suggèrent que cette protéine pourrait être impliquée dans le transport de membranes au cours de la formation de l'autophagosome (He *et al.*, 2008). mATG9 est distribuée de manière irrégulière sur les membranes de l'autophagosome et les régions de forte concentration de mATG9 pourraient être des sites d'ancrage et de fusion avec la membrane de l'autophagosome en formation (Gao *et al.*, 2010). De plus, mATG9 peut interagir avec BIF-1, une protéine qui induit une courbure membranaire, suggérant que mATG9 pourrait aussi être impliquée dans le processus de remodelage des membranes (Takahashi *et al.*, 2008).

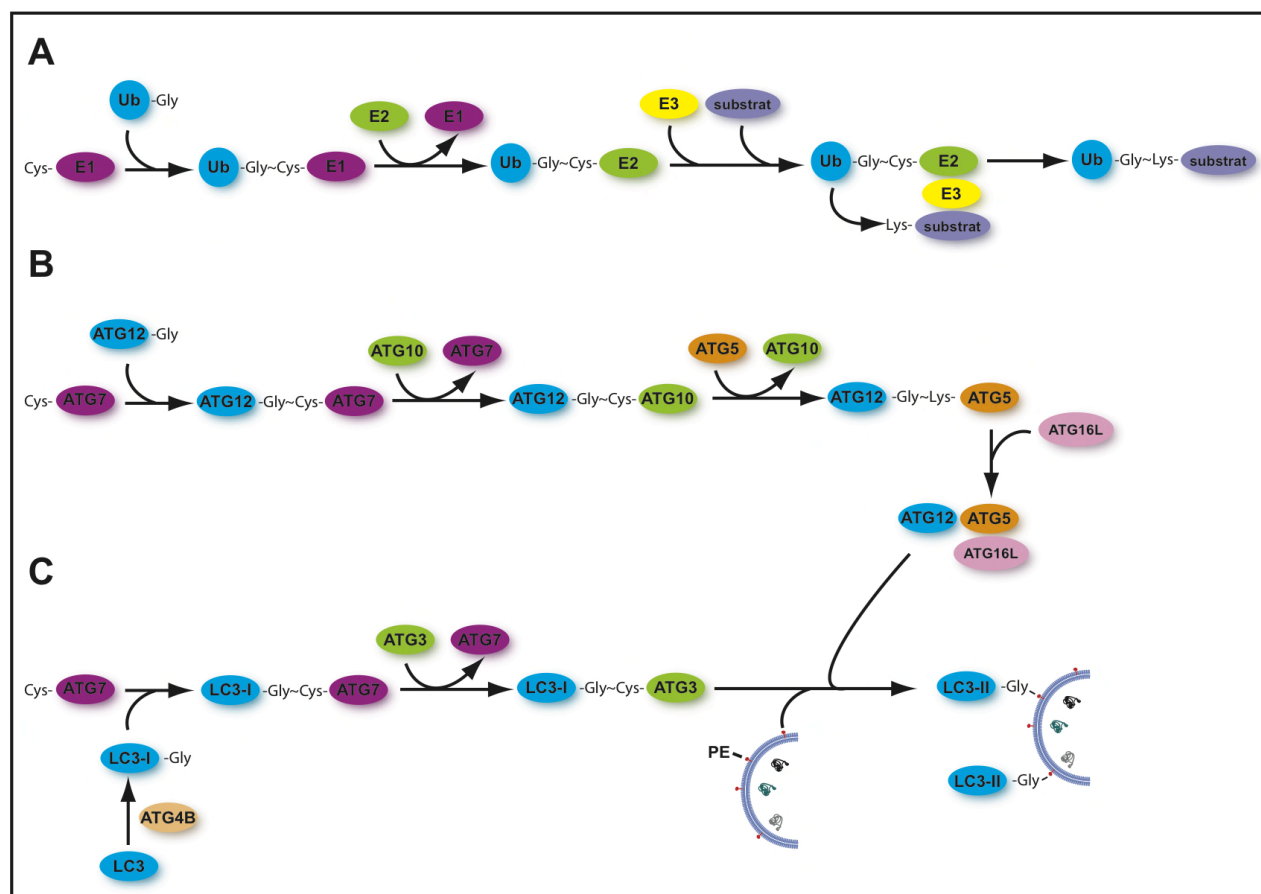
#### 3.1.4 Origine de la membrane autophagique

L'origine des phospholipides qui composent la membrane autophagique n'est pas encore élucidée et fait l'objet de nombreuses investigations. Différents auteurs suggèrent que ces phospholipides pourraient provenir du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, des endosomes, de la membrane plasmique, des mitochondries ou pourraient même être synthétisés *de novo*. Chez la levure, un site de formation des autophagosomes à proximité de la vacuole (l'équivalent des lysosomes) a été identifié. Plusieurs protéines ATG se concentrent alors pour former une structure appelée PAS (*p*re-*a*utophagosomal *s*tructure) à partir de laquelle se forme les autophagosomes (Suzuki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). L'existence du PAS chez les mammifères n'a pas encore été démontrée mais il pourrait être

formé près du réticulum endoplasmique. En effet, plusieurs molécules faisant partie de la cascade de signalisation ULK1 et PI3K sont nécessaires pour cibler le phagophore au niveau du réticulum endoplasmique: DFCP1 (*double FYVE-containing protein 1*) (Axe et al., 2008), ATG14L (Matsunaga et al., 2009; Matsunaga et al., 2010) et ULK1 (Itakura et al., 2008; Matsunaga et al., 2010). De plus, l'interaction entre le réticulum endoplasmique et le phagophore a été montrée par tomographie électronique dans deux études indépendantes (Hayashi-Nishino et al., 2009; Yla-Anttila et al., 2009). L'appareil de Golgi et l'endosome pourraient aussi contribuer à la formation de la membrane autophagique grâce à la présence de la protéine autophagique transmembranaire, ATG9, qui se localise au niveau du Golgi ainsi que de l'endosome (Young et al., 2006; Itoh et al., 2008). Finalement, les mitochondries et la membrane plasmique sont aussi considérées comme des sources potentielles des membranes de l'autophagosome (Hailey et al., 2010; Ravikumar et al., 2010).

### 3.2 Elongation

L'élongation de les doubles membranes autophagiques est également contrôlée par les protéines ATG et fait intervenir deux systèmes de conjugaison similaires au système de l'ubiquitinylation (Ohsumi, 2001). Dans le système d'ubiquitinylation, le précurseur de l'ubiquitine est clivé en aval de son résidu glycine en position C-terminale par une protéase. L'ubiquitine est ensuite liée à une enzyme E1, activée par la formation d'un lien thioester, puis transférée et conjuguée à une enzyme E2. Finalement, une troisième enzyme E3 reconnaît la protéine cible et favorise le transfert de l'ubiquitine sur un résidu lysine sur cette protéine cible (Weissman, 2001). Au cours de l'autophagie, la formation du premier complexe ATG5-ATG12-ATG16 implique l'intervention d'ATG7 et ATG10. Le deuxième complexe ATG8/LC3-PL implique quant à lui une protéolyse par ATG4 puis la conjugaison d'ATG8 à un phospholipide de la membrane autophagique par les protéines ATG7 et ATG3. Contrairement à l'ubiquitine, l'enzyme similaire à E1, ATG7, n'est pas spécifique d'une enzyme E2 et ces systèmes sont donc considérés comme non canoniques (Kaiser et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012). Chez les mammifères, l'homologue le plus étudié d'ATG8, MAP1LC3B (*microtubule-associated protein 1 light chain 3B*), subit une protéolyse pour produire la forme mature LC3-I puis est conjuguée à un phospholipide pour donner la forme conjuguée LC3-II (Kabeya et al., 2000) (**Figure 9**).



**Figure 9 : Comparaison du système de conjugaison de l'ubiquitine et des deux systèmes de conjugaison intervenant lors de la macroautophagie. (A)** Le système d'ubiquitylation. Les enzymes E1, E2 et E3 sont impliquées dans la conjugaison de la protéine ubiquitine à son substrat. **(B)** Le système de conjugaison ATG5-ATG12-ATG16L. La conjugaison d'ATG12 avec ATG5 débute par l'activation d'ATG12 par l'enzyme ATG7 et le transfert d'ATG12 à ATG5 par l'enzyme ATG10. Le conjugué ATG12-ATG5 forme ensuite un complexe avec ATG16L. **(C)** Un exemple du système de conjugaison ATG8-PE. LC3 est d'abord clivée par l'enzyme ATG4B pour donner la forme mature (LC3-I). LC3-I est activée par l'enzyme ATG7, transférée sur ATG3 et conjuguée à un phospholipide (PE) par l'activité E3 ligase du complexe ATG5-ATG12-ATG16L pour donner la forme lipidée (LC3-II).

### 3.2.1 Système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L

ATG12 a été la première protéine ATG similaire à l'ubiquitine à être identifiée (Mizushima *et al.*, 1998). La protéine ATG12 possède un résidu glycine à son extrémité C-terminale et ne nécessite donc aucun clivage avant son activation par ATG 7 (Mizushima *et al.*, 1998; Tanida *et al.*, 2001). ATG12 est ensuite transférée à une enzyme appelée ATG10 (Shintani *et al.*, 1999; Mizushima *et al.*, 2002) et finalement conjuguée de manière covalente au résidu lysine 149 d'ATG5 (Mizushima *et al.*, 1998). Contrairement à l'ubiquitine, il n'y a pas d'enzyme E3 impliquée dans la conjugaison d'ATG12 sur ATG5 et cette interaction semble être constitutive et irréversible (Mizushima *et al.*, 1998). Le complexe ATG12-ATG5

interagit ensuite avec la protéine ATG16L d'une manière non-covalente pour former un complexe trimérique qui s'oligomériserait ultérieurement, grâce à la capacité d'homodimérisation d'ATG16L, pour former un complexe multimérique d'environ 800 kDa (Mizushima et al., 1999; Mizushima et al., 2003). Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L est principalement localisé sur la membrane extérieure de l'autophagosome et il est libéré dans le cytoplasme, par un mécanisme inconnu, après la formation de l'autophagosome (Mizushima et al., 2001; Mizushima *et al.*, 2003).

L'établissement du complexe ATG12-ATG5-ATG16L est indispensable au déroulement de l'autophagie et semble jouer un rôle indirect dans l'étape d'élongation membranaire de l'autophagosome par régulation de la formation du complexe ATG8/LC3-PE (Mizushima *et al.*, 2001; Geng and Klionsky, 2008). En effet, ATG12-ATG5-ATG16L semble induire le recrutement du complexe LC3-ATG3 à la membrane du phagophore, probablement par l'interaction entre ATG12 et ATG3 (Fujita et al., 2008). Par ailleurs, ce complexe possède une activité similaire à une enzyme E3 et facilite la conjugaison d'ATG8/LC3 aux phospholipides (Hanada et al., 2007; Fujita *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Système de conjugaison ATG8/LC3-PE

Chez les mammifères, deux sous-familles regroupent les homologues d'ATG8 : la sous-famille MAP1LC3 (aussi appelée LC3) comprenant LC3A, B et C et la sous-famille GABARAP, comprenant GABARAP, GABARAPL1/GEC1 et GABARAPL2/GATE-16. Ces deux sous-familles ont des rôles distincts dans la régulation de l'autophagie (Weidberg et al., 2010). Les membres de la sous-famille LC3 interviennent lors des stades précoces de l'élongation de la membrane autophagique alors que les membres de la sous-famille GABARAP jouent un rôle plus tardif au niveau de la fermeture de la membrane de l'autophagosome. Ces différentes protéines sont liées aux phospholipides selon un cycle de conjugaison similaire à celui de l'ubiquitine (Kabeya *et al.*, 2004). Dans ce système, les cinq derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale de LC3B sont d'abord éliminés par un clivage effectué par la cystéine protéase ATG4B, ce qui provoque l'exposition du résidu glycine 119, pour donner la forme mature LC3-I (Hemelaar *et al.*, 2003; Tanida et al., 2004). Cette protéine est ensuite activée par une enzyme E1 (ATG7) puis conjuguée à une PE (phosphatidyléthanolamine) grâce à une enzyme E2 (ATG3) et à l'activité E3 du complexe ATG12-ATG5, pour donner la forme conjuguée LC3-II (Kabeya *et al.*, 2000; Tanida et al., 2004; Hanada *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2008). Comme mentionné précédemment, la localisation de LC3-II à la membrane de



l'autophagosome est dépendante du complexe ATG12-ATG5-ATG16L (Suzuki *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2008). LC3-II peut être localisée au niveau des membranes internes et externes de l'autophagosome et reste associée à la membrane jusqu'à la maturation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Kabeya *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2004). A ce stade, les protéines LC3 présentes à l'extérieur de l'autophagosome sont clivées par ATG4B pour permettre leur recyclage tandis que les protéines LC3 présentes à l'intérieur sont dégradées par les enzymes lysosomales avec le reste du contenu de l'autophagosome (Tanida *et al.*, 2004). La transformation de LC3-I en LC3-II est inductible en conditions de carence en nutriments ou en présence d'inducteurs de l'autophagie dans différents types cellulaires (Kabeya *et al.*, 2000; Mizushima *et al.*, 2004). De toutes les protéines ATG, LC3 est la seule qui reste associée à l'autophagosome jusqu'à la fusion avec le lysosome et est par conséquent utilisée couramment comme marqueur de la formation des autophagosomes (Klionsky, 2007).

La phospholipidation de LC3 est une étape essentielle pour l'allongement de la membrane autophagique. Chez la levure, ATG8-PE est le complexe principal participant à l'allongement de la membrane du phagophore (Abeliovich *et al.*, 2000). En effet, ATG8 est plus abondante que ATG16L (membre du premier système de conjugaison) sur le phagophore et la quantité d'ATG8 semble être proportionnelle à la taille des vésicules formées (Huang *et al.*, 2000; Nakatogawa *et al.*, 2007; Geng *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2008).

Récemment, un rôle de protéine d'échafaudage a été proposé pour les homologues d'ATG8 chez les mammifères. Un exemple est l'interaction des ATG8 avec les protéines contenant un motif LIR (*LC3-interacting region*) présentant la séquence consensus W/Y/F-X-X-I/L (Rozenknop *et al.*, 2011). On retrouve une telle séquence dans les protéines qui forment les complexes ULK1/2 : ULK1, ULK2, ATG13 et FIP200 (Okazaki *et al.*, 2000; Alemu *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2012). Dans ce cas, les protéines ATG8 pourraient stabiliser l'association des complexes ULK1/2 avec le phagophore. Par contre, chez la levure, l'interaction d'ATG1 avec ATG8 sur l'autophagosome conduit à la dégradation du complexe ATG1-ATG13, suggérant plutôt un rôle négatif pour cette interaction dans la régulation de l'autophagie (Kraft *et al.*, 2012). Les homologues d'ATG8 interagissent aussi avec la protéine OATL1 (*ornithine aminotransferase-like 1*), une protéine Rab33B-GAP (*Ras-related protein in the brain 33B-GTPase activating protein*) via son motif LIR (Itoh *et al.*, 2011) et une surexpression de la protéine OATL1 conduit à une inhibition de la maturation de

l'autophagosome (Itoh *et al.*, 2011). En effet, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L serait recruté à la membrane par l'interaction de la protéine Rab33B avec ATG16L. Ce complexe ATG12-ATG5-ATG16L pourrait ainsi déterminer la localisation des protéines ATG8 et catalyser la conjugaison ATG8-PE par son activité E3. Ensuite, OATL1 serait recrutée au niveau des ATG8-PE pour inactiver Rab33B, aboutissant à une inhibition de la maturation de l'autophagosome.

Parallèlement, les homologues d'ATG8 peuvent agir comme site d'ancrage sur l'autophagosome pour les protéines cargos au cours de l'autophagie sélective. Pour cela, les ATG8 interagissent avec des adaptateurs protéiques qui sont liés à des substrats ou cargos destinés à être dégradés de façon spécifique par la voie autophagique (voir section 4). Par exemple, les adaptateurs SQSTM1/p62 (*sequestosome 1*), NBR1 (*neighbour of brca1*) ou ALFY (*autophagy linked FYVE protein*) agissent comme des intermédiaires entre les agrégats de protéines ubiquitinylées et la protéine ATG8 en se liant d'une part, à l'ubiquitine grâce à leurs domaines UBA (*ubiquitin associated domain*) et d'autre part, aux protéines ATG8 sur la membrane de l'autophagosome *via* leur domaine LIR (Bjorkoy *et al.*, 2005; Kirkin *et al.*, 2009; Clausen *et al.*, 2010; Filimonenko *et al.*, 2010).

### 3.3 Maturation et Dégradation

La maturation de l'autophagosome nécessite la participation des compartiments d'endocytose tels que les endosomes précoces et tardifs ou les corps multivésiculaires, qui peuvent fusionner avec les autophagosomes. En effet, durant l'autophagie, les corps multivésiculaires co-localisent avec les autophagosomes (Fader *et al.*). ESCRT-III, un complexe impliqué dans le transport des endosomes, est nécessaire pour la fusion des autophagosomes avec les corps multivésiculaires et les lysosomes (Filimonenko *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Rusten *et al.*, 2007). La protéine HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*), une autre protéine impliquée dans le tri endosomal, peut se lier aux PI3P pour faciliter la maturation des autophagosomes (Tamai *et al.*, 2007). Rab7 et Rab11, présentes au niveau du système d'endocytose, sont également nécessaires pour la fusion des autophagosomes avec les endosomes/lysosomes et les corps multivésiculaires, respectivement (Gutierrez *et al.*, 2004; Jager *et al.*, 2004; Fader *et al.*, 2008). D'autres facteurs sont également impliqués dans la maturation de l'autophagosome : les récepteurs de fusion SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*), Vtilb, VAMP3 et VAMP7 (Atlashkin *et al.*, 2003; Fader *et al.*, 2009), les protéines membranaires

endosomales/lysosomales, LAMP1 et LAMP2 (Tanaka et al., 2000; Eskelinen et al., 2004) et une protéine cible de p53, DRAM (Crichton et al., 2006).

Le complexe BECLIN1-UVRAG est associé avec les endosomes et semble jouer un rôle dans la maturation des autophagosomes par recrutement des protéines de fusion (Liang et al., 2006; Itakura *et al.*, 2008; Liang et al., 2008). De plus, la protéine Rubicon peut s'associer avec ce complexe incluant UVRAG au niveau des endosomes pour réguler négativement la maturation de l'autophagosome (Matsunaga *et al.*, 2009; Zhong et al., 2009).

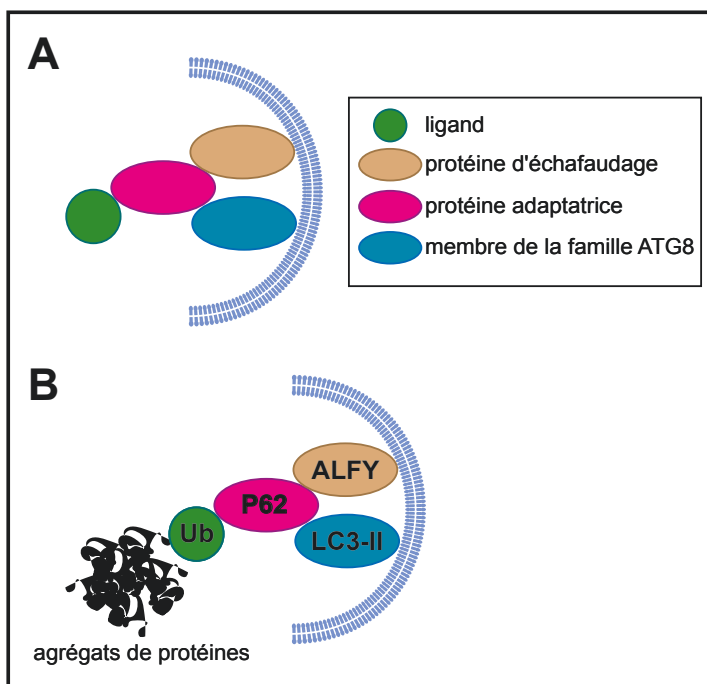
Le cytosquelette, et plus particulièrement, le réseau de microtubules joue un rôle important dans la maturation des autophagosomes. En effet, l'inhibition de la polymérisation des microtubules, induite par la vinblastine ou le nocodazole, bloque la maturation des autophagosomes, tandis que la stabilisation des microtubules par le taxol augmente la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Yu and Marzella, 1986; Hoyvik et al., 1991; Aplin et al., 1992). Des résultats récents ont montré l'importance de plusieurs protéines dans le transport des autophagosomes *via* les microtubules. Par exemple, la protéine kinésine-1 semble jouer un rôle dans le transport des autophagosomes étant donné que des inhibiteurs spécifiques bloquent la mobilité des autophagosomes (Geeraert et al., 2010). De plus, la protéine FYCO1 (*FYVE and coiled-coil domain containing 1*) contient un site potentiel de liaison avec la kinésine-1 et se lie à LC3 et PI3P pour faciliter le transport des autophagosomes (Pankiv et al., 2010).

Finalement, l'autophagosome va fusionner avec le lysosome, libérant la membrane interne de l'autophagosome et son contenu dans l'environnement acide du lysosome pour y être dégradés. Cette dégradation est dépendante de l'acidification du compartiment intérieur de l'autophagosome et de l'activité des hydrolases lysosomales. Ainsi, un traitement par la bafilomycine A1 ou la concanamycin A, deux traitements qui bloquent les pompes à protons lysosomales (H<sup>+</sup>-ATPase), provoquent une augmentation du pH de l'autophagolysosome et aboutit à une accumulation des vacuoles autophagiques (Yamamoto et al., 1998; Mousavi et al., 2001; Ramachandran et al., 2009).

#### **4. L'Autophagie sélective**

L'autophagie est considérée comme sélective lorsque des protéines ou des organites sont ciblés de façon spécifique vers l'autophagosome. Il existe différents types d'autophagie sélective. On peut citer notamment l'agrégophagie (l'autophagie des agrégats protéiques), la

mitophagie (dégradation sélective des mitochondries), la pexophagie (dégradation sélective des peroxyosomes), la réticulophagie (dégradation sélective du réticulum endoplasmique), la xénophagie (dégradation sélective de microbes ou virus) et la microautophagie fragmentaire du noyau (dégradation sélective d'un fragment du noyau). L'autophagie sélective est considérée comme un mécanisme de « contrôle de qualité » dans la cellule et il est donc nécessaire de pouvoir identifier, de façon spécifique, les substrats à dégrader parmi tous les constituants cellulaires. Pour cela, il existe différentes protéines adaptatrices qui font le lien de façon spécifique entre le substrat à dégrader et les protéines ATG présentes sur l'autophagosome. Les composants de l'autophagie sélective comprennent généralement : un ligand à dégrader, un adaptateur et une protéine appartenant à la famille ATG8 (**Figure 10**). Par exemple, dans le cas de l'autophagie sélective des agrégats de protéines ubiquitinylées, le ligand (les agrégats de protéines ubiquitinylées) sera reconnu par un adaptateur autophagique (p62 ou NBR1, par exemple) qui interagit alors avec un des membres de la famille ATG8 pour cibler les substrats vers l'autophagie. Récemment, ALFY a été décrite comme une protéine d'échafaudage qui fait le lien entre l'adaptateur p62 et les PI3P incorporés dans la membrane de l'autophagosome pour faciliter le rapprochement de l'adaptateur et des protéines ATG8 et ainsi faciliter leur interaction.

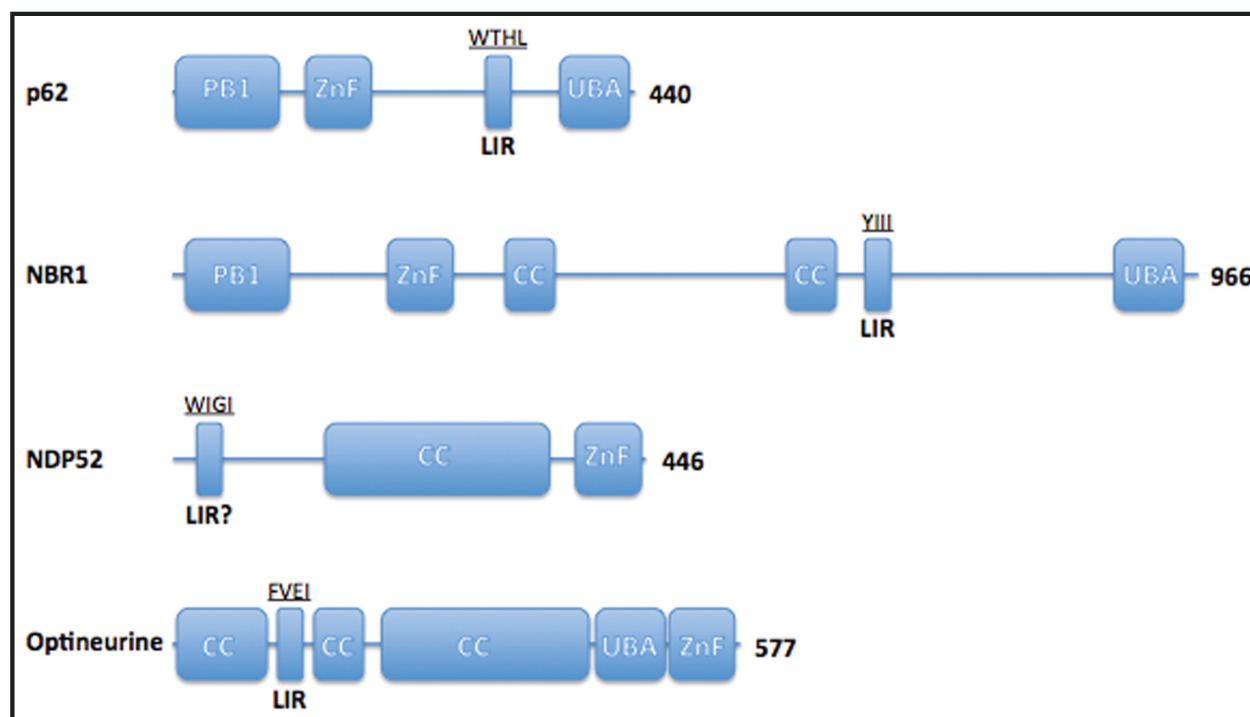


**Figure 10 : Complexes intervenant au cours de l'autophagie sélective. (A)** Un modèle général d'un complexe formé entre un ligand (vert), une protéine adaptatrice (rose), un membre de la famille ATG8 (bleu) et la membrane interne du phagophore. La protéine d'échafaudage, parfois présente dans ce complexe, est indiquée en brun. **(B)** Exemple d'un complexe de protéines adaptatrices au cours de l'agrégation.

## 4.1 Les Adaptateurs des Substrats Ubiquitylés

### 4.1.1 SQSTM1/p62

L'adaptateur de l'autophagie spécifique le plus étudié chez les mammifères est la protéine p62. Elle agit comme intermédiaire entre les agrégats de protéines ubiquitylées et les protéines ATG8, en liant à la fois l'ubiquitine grâce à son domaine UBA et la protéine LC3 *via* son domaine LIR (**Figure 11**) (Pankiv *et al.*, 2007; Noda *et al.*, 2010). Les substrats ubiquitylés reconnus par p62 sont nombreux et comptent par exemple les agrégats de la forme mutante de Huntington, les agrégats d'alpha synucléine (Bjorkoy *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2012), les bactéries (Zheng *et al.*, 2009), les peroxysomes (Kim *et al.*, 2008) et les mitochondries (Geisler *et al.*, 2010). *In vitro*, p62 peut se lier avec la mono-ubiquitine ainsi qu'avec les chaînes d'ubiquitine liées par les lysines K48 ou K63, mais elle présente *in vivo* une préférence pour les chaînes d'ubiquitine liées par les lysines K63 (Seibenhener *et al.*, 2004; Cavey *et al.*, 2005; Raasi *et al.*, 2005).



**Figure 11 : Représentation des domaines des protéines adaptatrices p62, NBR1, NDP52 et Optineurine qui lient l'ubiquitine et les protéines de la famille ATG8.** Les sites d'interaction avec les protéines de la famille ATG8 (LIR, pour *LC3-interacting region*) démontrés (p62, NBR1, Optineurine) ou potentiels (NDP52). Les numéros représentent la longueur de la protéine humaine en acides aminés. Ces protéines interagissent avec l'ubiquitine par leurs domaines UBA (*Ubiquitin-associated domain*) ou ZnF (*zinc finger domain*) dans le cas de NDP52. CC : *coiled-coil domain* ; PB1 : *Phox and Bem1 domain*.

Cette protéine adaptatrice semble jouer un rôle important dans différentes maladies. Par exemple, le domaine UBA de p62 est muté dans la maladie de Paget, une maladie où l'activité des ostéoclastes est plus importante que celle des ostéoblastes, ayant pour conséquence une dégradation osseuse anormale (Cavey *et al.*, 2005). Une accumulation de la protéine p62 a également été décrite dans des corps d'inclusion présents dans certaines pathologies comme la maladie d'Huntington, d'Alzheimer, de Parkinson ou la stéatohépatite (Zatloukal *et al.*, 2002; Nagaoka *et al.*, 2004; Rue *et al.*, 2013). Des études ont également montré que des souris invalidées pour le gène *p62* présentent une dégénérescence au niveau du SNC avec une accumulation d'ubiquitine (Ramesh Babu *et al.*, 2008; Wooten *et al.*, 2008). De plus, la protéine p62 est accumulée dans des agrégats protéiques ubiquitinylés suite à un stress cellulaire tel que la privation d'acides aminés, un stress oxydant ou l'inhibition du processus autophagique (Szeto *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2007). En effet, p62 contient un domaine PB1 (*Phox* et *Bem1p*) qui lui permet de s'auto-polymériser et ainsi de pouvoir participer à la formation des agrégats de protéines (Bjorkoy *et al.*, 2005). Ce domaine permet également l'interaction de p62 avec une autre protéine adaptatrice de l'autophagie sélective, NBR1.

#### 4.1.2 NBR1

La protéine NBR1 a récemment été identifiée comme un adaptateur de l'autophagie spécifique (Kirkin *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que NBR1, comme p62, est impliquée dans la dégradation autophagique de protéines ubiquitinylées et ont montré que NBR1 contient deux domaines LIR1 et LIR2 et un domaine UBA. Elle possède aussi un domaine *coiled-coil* grâce auquel elle peut s'homodimériser. NBR1 se lie avec les chaînes d'ubiquitine liées par les lysines K48 ou K63 mais démontre une préférence pour les chaînes d'ubiquitine liées par les lysines K63 (Kirkin *et al.*, 2009) (Waters *et al.*, 2009). Bien que cette protéine contienne un domaine PB1 grâce auquel elle peut se lier à p62, ce domaine ne semble pas être nécessaire pour son interaction avec les autophagosomes ou les protéines ubiquitinylées (Waters *et al.*, 2009).

NBR1 est impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires tels que la dystrophie musculaire héréditaire (Lange *et al.*, 2005) et la dégradation de plusieurs substrats y compris les protéines mutantes de Huntington (Rue *et al.* 2013), l'alpha synucléine (Odagiri *et al.*, 2012; Rue *et al.*, 2013), les peroxysomes (Deosaran *et al.*, 2012) et les récepteurs à

activité tyrosine kinase : FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) et EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Mardakheh et al., 2009; Mardakheh et al., 2010).

#### 4.1.3 NDP52 et Optineurine

Les deux autres adaptateurs d'autophagie spécifique identifiés à ce jour, NDP52 et Optineurine, jouent un rôle dans la dégradation autophagique de bactéries qui envahissent la cellule. Le premier, NDP52 (*nuclear dot protein 52kDa*), peut lier les bactéries ubiquitinylées de type *Salmonella enterica* ainsi que la protéine LC3 pour induire leur dégradation par autophagie (Thurston et al., 2009; Cemama et al., 2011; Mostowy et al., 2011). Dans cette étude, l'extinction de NDP52 par siRNA réduit le nombre de bactéries visibles dans les autophagosomes ainsi que la co-localisation de marqueurs bactériens avec LC3. NDP52 est aussi impliquée dans la dégradation des bactéries ubiquitinylées de type *Listeria monocytogenes* et *Shigella flexneri* (Mostowy et al. 2011.)

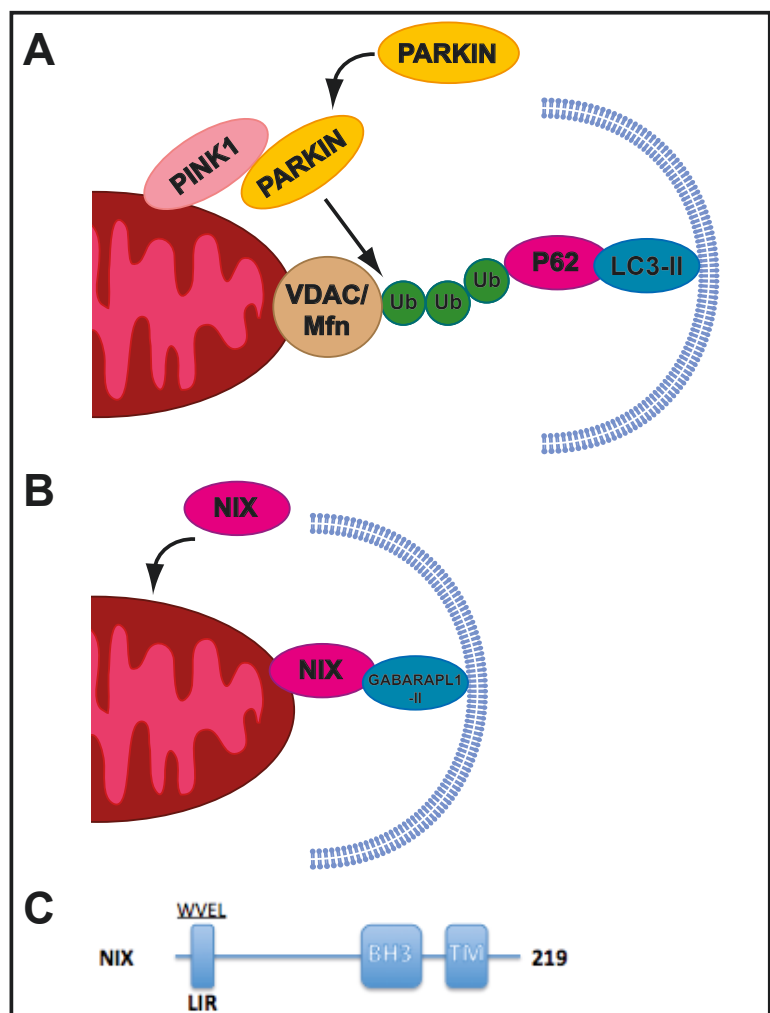
Enfin, la protéine Optineurine agit également comme un adaptateur autophagique pour les bactéries *Salmonella enterica* ubiquitinylées (Wild et al., 2011). En effet, dans cette étude, les auteurs ont identifié un domaine LIR au sein de l'Optineurine. De plus, ils ont démontré que sa fonction dans la dégradation par autophagie de *Salmonella enterica* est augmentée quand elle est phosphorylée au niveau d'une sérine proche de son domaine LIR.

#### 4.2 La Mitophagie

Comme mentionné précédemment, l'autophagie peut intervenir dans la dégradation de certains organites comme les mitochondries. En plus de leurs rôles dans plusieurs fonctions métaboliques telles que l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, les mitochondries sont aussi un site de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) (Saraste, 1999). Les ROS générées comme sous-produits de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries peuvent engendrer des dommages oxydatifs, conduisant souvent à la mort cellulaire. A ce titre, l'élimination des mitochondries endommagées est impérative pour la survie des cellules. Par ailleurs, l'accumulation de mitochondries endommagées est impliquée dans le vieillissement cellulaire et plusieurs maladies neurodégénératives (Saraste, 1999). Ce processus peut être induit lors de la perturbation du potentiel de membrane mitochondrial après traitement par un agent découplant comme le CCCP (cyanide *m-chlorophenylhydrazone*) (Narendra et al.,

2008; Sandoval et al., 2008), après une privation de nutriments dans les hépatocytes (Elmore et al., 2001) et par des mutations de l'ADN mitochondrial (Suen et al., 2010). La mitophagie peut aussi cibler la totalité des mitochondries, même saines, lors de la différenciation des réticulocytes (Schweers et al., 2007; Sandoval *et al.*, 2008) ou lors de la dégradation des mitochondries paternelles après fécondation (Al Rawi et al., 2011; Sato and Sato, 2011). Ce processus nécessite des effecteurs spécifiques de la mitophagie tels que la protéine NIX (*NIP3-like protein X*), aussi appelée BNIP3L (*Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa protein interacting protein 3-like*), la protéine PARKIN/PARK2 (*parkinsonien protein 2*) et la protéine PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*) mais aussi la protéine p62, précédemment décrite pour la dégradation de substrats ubiquitinylés (**Figure 12**).

**Figure 12 : Mécanisme de la mitophagie dans les cellules de mammifères et représentation des différents domaines de la protéine adaptatrice, NIX.** Deux mécanismes de dégradation des mitochondries dépendants des lysosomes sont connus chez les mammifères : PINK/PARKIN ou NIX dépendants. **(A)** La dépolarisation de la membrane mitochondriale induit l'accumulation de la protéine PINK1 au niveau de la membrane mitochondriale externe. PINK1 recrute la protéine E3 ligase, PARKIN, induisant l'ubiquitylation des substrats mitochondriaux tels que les protéines VDAC ou Mitofusine. P62 interagit par la suite avec l'ubiquitine et LC3 (ou un autre membre de la famille ATG8 chez les mammifères) pour cibler les mitochondries à la membrane interne du phagosome. **(B)** Au cours de la différenciation des réticulocytes ou après traitement avec un agent découplant, la protéine NIX est localisée au niveau de la membrane externe des mitochondries. L'interaction entre NIX et GABARAPL1 (ou un autre membre de la famille ATG8) contribue à la dégradation spécifique autophagique des mitochondries. **(C)** L'organisation structurale des domaines de la protéine adaptatrice, NIX. Son site d'interaction avec les protéines de la famille ATG8 (LIR, pour *LC3-interacting region*) est indiqué. BH3 : *Bcl-2 homology 3 domain* ; TM : *transmembrane domain*.





#### 4.2.1 La mitophagie dépendante de NIX

NIX, une protéine transmembranaire mitochondriale, fait partie de la famille des protéines Bcl-2. Elle est essentielle pour l'élimination des mitochondries lors de la différenciation des réticulocytes (Schweers *et al.*, 2007; Sandoval *et al.*, 2008). Elle possède un domaine LIR dans sa région N-terminale et l'élimination de ce domaine retarde la dégradation des mitochondries lors de la maturation des réticulocytes (Novak *et al.*, 2010). De plus, les souris NIX<sup>-/-</sup> conservent leurs mitochondries érythrocytaires et développent une anémie à cause de la mort de leurs hématies (Sandoval *et al.*, 2008). NIX peut également jouer un rôle dans la dégradation des mitochondries endommagées. En effet, Dikic et ses collègues ont démontré que, suite à un traitement découplant avec le CCCP, Nix est recrutée à la membrane mitochondriale *via* son interaction avec les membres des sous-familles LC3 et GABARAP, notamment GABARAPL1 (Novak *et al.*, 2010). Le groupe de Yin a aussi montré que NIX joue un rôle au cours de la mitophagie dépendante de la protéine PARKIN (Ding *et al.*, 2010). Cette étude a démontré que NIX est nécessaire pour la relocalisation de PARKIN du cytosol aux mitochondries après traitement avec le CCCP.

#### 4.2.2 La mitophagie dépendante de PARKIN et PINK1

PARKIN est une E3 ligase de l'ubiquitine qui est mutée dans certaines formes de la maladie de Parkinson (Kitada *et al.*, 1998) et qui subit une relocalisation du cytosol aux mitochondries après traitement avec le CCCP ou en présence de niveaux de ROS élevés (Narendra *et al.*, 2008). La protéine PINK1, une kinase mitochondriale qui est aussi mutée dans certaines formes de la maladie de Parkinson (Valente *et al.*, 2004), est nécessaire pour la localisation mitochondriale de PARKIN durant la mitophagie. En conditions normales, PINK1 est rapidement dégradée au niveau de la mitochondrie mais dans le cas où la membrane est dépolarisée, la protéine n'est plus dégradée, se co-localise au niveau de la membrane mitochondriale externe pour recruter et activer la protéine PARKIN (Matsuda *et al.*, 2010; Narendra *et al.*, 2010). Une fois localisée au niveau des mitochondries, PARKIN conduit à la dégradation des mitochondries endommagées par mitophagie par un mécanisme qui n'est pas encore complètement élucidé. Un modèle proposé suggère que PARKIN ubiquitinye des protéines mitochondriales, notamment VDAC1 (*voltage-dependent anion channel 1*) et Mfn1/2 (*mitofusin 1 et 2*) (Gegg *et al.*, 2010; Geisler *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). Ces protéines ubiquitinylées sont alors reconnues par la protéine adaptatrice p62 qui est elle-même reconnue par les protéines ATG8, ce qui induit le ciblage des mitochondries

aux autophagosomes. En revanche, PARKIN peut aussi interagir avec la protéine AMBRA1 (Van Humbeeck et al., 2011; Van Humbeeck et al., 2011), un activateur du complexe BECLIN1, suggérant que cette protéine pourrait également jouer un rôle dans l'activation de BECLIN1 et la nucléation du phagophore.

### III L'Autophagie Neuronale

La détection de vacuoles autophagiques dans les neurones post-mitotiques a été décrite très tôt dans l'histoire de l'autophagie et est principalement activée après axotomie ou excitotoxicité dans les neurones (Dixon, 1967). Une accumulation d'autophagosomes dans les neurones a également été décrite dans des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de Huntington. Ce taux élevé d'autophagie participe à l'élimination des agrégats protéiques et peut conduire à la mort cellulaire (Rubinsztein et al., 2005). Au niveau du SNC, Mizushima et collaborateurs ont suggéré qu'il existe deux formes d'autophagie : une forme constitutive, l'autophagie basale, et une autophagie induite (Mizushima, 2005). L'autophagie basale est détectée dans la majorité des cellules saines à des taux variables mais a été, jusqu'à récemment, considérée comme très faible dans le SNC (Mizushima *et al.*, 2004). Néanmoins, la création de souris déficientes pour l'autophagie dans le SNC, décrites ci-dessous, a démontré l'importance de cette autophagie basale dans le cerveau.

#### 1. L'autophagie neuronale basale

##### 1.1 L'autophagie neuronale et le protéasome

L'autophagie basale dans le SNC est essentielle pour maintenir l'homéostasie de la cellule notamment par l'élimination de protéines et organites endommagés. Les neurones sont des cellules post-mitotiques avec une activité métabolique élevée. Ces cellules sont très vulnérables à une accumulation de protéines ou d'organites endommagés ou à un stress oxydatif conduisant à l'accumulation de ROS. Par exemple, un dysfonctionnement du système de dégradation par le protéasome a été démontré comme étant impliqué dans la pathogenèse de différentes maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington, des maladies à Prions et la sclérose latérale amyotrophique (Ciechanover and Brundin, 2003). L'inhibition du protéasome entraîne une augmentation de l'activité autophagique dans plusieurs modèles neuronaux (Ding et al., 2003; Rideout et al.,

2004; Iwata et al., 2005; Bedford et al., 2008). Cette induction semble être un mécanisme de protection cellulaire puisque les phénotypes dégénératifs associés à un dysfonctionnement du protéasome sont amplifiés quand la cellule est déficiente pour l'autophagie. Inversement, ces phénotypes sont réduits lorsque l'autophagie est induite préalablement par un composé tel que la rapamycine (Pandey et al., 2007; Pan et al., 2008; Du et al., 2009).

### 1.2 Modèles neuronaux déficients pour l'autophagie

Les résultats les plus convaincants démontrant un rôle de l'autophagie dans la maintenance de l'homéostasie des neurones ont été obtenus à partir d'expériences sur des souris invalidées pour différents gènes impliqués dans l'autophagie tels que *atg5*, *atg7* ou *fip200* (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Komatsu et al., 2007; Nishiyama et al., 2007; Liang et al., 2010) (**Tableau 2**). Dans ces souris, la perte d'activité autophagique dans le SNC conduit à la mort neuronale et à l'apparition de phénotypes similaires à ceux des maladies neurodégénératives. Les souris mutantes présentent également un retard de croissance et des défauts moteurs et comportementaux. De plus, bien que le système de dégradation par le protéasome ne soit pas altéré dans ces souris, l'inhibition seule de l'autophagie induit des phénotypes liés à la neurodégénérescence. Dans ces modèles, la mort neuronale est précédée par une accumulation d'inclusions comportant des molécules d'ubiquitine, de protéine p62 et de protéine LC3, suggérant que l'autophagie est importante pour l'élimination des protéines anormales (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2007; Komatsu *et al.*, 2007). Tanaka et collègues ont également démontré que l'accumulation d'inclusions dans les souris ATG7<sup>-/-</sup> est dépendante de la protéine p62 mais que l'établissement de souris déficientes pour ces deux protéines (ATG7<sup>-/-</sup>; p62<sup>-/-</sup>) ne permet pas d'inhiber ce phénotype (Komatsu *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que la perte de l'autophagie basale conduit à la dégénérescence neuronale indépendante de l'accumulation de ces inclusions.

Gène	Fonction de la protéine	Phénotypes neuronaux après KO/KD dans le système nerveux central	Références des phénotypes neuronaux
<i>Induction/Nucléation</i>			
<b>ulk (atg1)</b>	protéine kinase sérine/thréonine (régulation de l'initiation de la formation des autophagosomes)	endocytose de NGF réduite, anomalie du développement axonal (MM) ; anomalie du développement axonal, paralysie, vésicules anormales, différenciation arrêtée (CE)	(McIntire et al., 1992; Ogura et al., 1994; Zhou et al., 2007)
<b>fip200 (atg17)</b>	constituant du complexe ULK1/ATG13/FIP200 (régulation de l'initiation de la formation des autophagosomes)	neurodégénérescence, dégénérescence axonale, mort cellulaire (MM)	(Liang et al., 2010)
<b>beclin1 (atg6)</b>	constituant du complexe PI3K de classe III (régulation de l'initiation de la formation des autophagosomes)	neurodégénérescence, anomalies lysosomiales (MM)	(Pickford et al., 2008)
<b>ambra1</b>	constituant du complexe PI3K de classe III	anomalies du tube neural, agrégats ubiquitinylés, division cellulaire asymétrique, mort cellulaire (MM)	(Fimia et al., 2007)
<b>pik3c3 (vps34)</b>	constituant du complexe PI3K de classe III (régulation de l'initiation de la formation des autophagosomes)	agrégats de protéines, locomotion anormale (CE)	(Simmer et al., 2003; Hamamichi et al., 2008)
<i>Systèmes de Conjugaisons (Formation des autophagosomes)</i>			
<b>atg7</b>	E1 enzyme (activation de la conjugaison de LC3 et ATG12)	déficits comportementaux, perte neuronale, inclusions, dystrophie axonale, agrégats ubiquitinylés, dégénérescence axonale (MM) ; agrégats ubiquitinylés, dégénérescence neuronale (DM) ; agrégation des protéines anormales (CE)	(Komatsu et al., 2006; Komatsu et al., 2007; Hamamichi et al., 2008)
<b>lc3</b>	formation/élongation de la membrane autophagosomale	agrégats de protéines anormales (CE)	(Toth et al., 2007; Hamamichi et al., 2008)
<b>atg5</b>	constituant du complexe ATG12/5/16L qui possède l'activité E3 pour la conjugaison de LC3 à un	déficits moteurs progressifs, accumulation de corps d'inclusion, neurodégénérescence, vacuoles	(Hara et al., 2006; Nishiyama et al.,

	phospholipide	aberrantes dans les cellules de Purkinje (MM)	2007)
<i>atg12</i>	constituant du complexe ATG12/5/16L qui possède l'activité E3 pour la conjugaison de LC3 à un phospholipide	agrégats de protéines anormales (CE)	(Hamamichi <i>et al.</i> , 2008)

**Tableau 2 : Exemples de modèles knockout (KO) ou knockdown (KD) neuronaux et leurs phénotypes.** CE : *C. elegans* ; DM : *D. melanogaster* ; MM : *M. musculus*. D'après (Jaeger and Wyss-Coray, 2009).

### 1.3 L'homéostasie des synapses

L'autophagie neuronale semble aussi jouer un rôle important dans l'homéostasie de la synapse en régulant sa taille et l'expression des différentes protéines synaptiques. Récemment, une étude a démontré que l'autophagie intervient dans le développement des synapses dans la jonction neuromusculaire chez la Drosophile avec notamment une corrélation entre l'augmentation ou la diminution du flux autophagique et la taille des synapses (Shen and Ganetzky, 2009). Au niveau pré-synaptique, la protéine autophagique ATG1 est impliquée dans la régulation de la structure synaptique. Chez la Drosophile, UNC-51 (*uncoordinated family member 51*), l'homologue d'ATG1, peut moduler la densité synaptique en inhibant l'activité d'ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*). En effet, en l'absence d'UNC-51, l'activité d'ERK est augmentée et conduit à une réduction de la densité synaptique et à une diminution de l'expression de la protéine Bruchpilot impliquée dans la libération de neurotransmetteurs (Wairkar et al., 2009). Plus récemment, un rôle de l'autophagie dans la dégradation des vésicules pré-synaptiques a également été décrit (Hernandez et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que la rapamycine augmente le nombre de vésicules autophagiques au niveau pré-synaptique et réduit le volume de l'axone, le nombre de vésicules synaptiques ainsi que la quantité de dopamine relarguée. Au niveau post-synaptique, le régulateur négatif de l'autophagie, mTOR, est localisé dans les dendrites des neurones de l'hippocampe où son activité est liée à la plasticité synaptique à long-terme ainsi qu'à la synthèse de protéines dendritiques (Gong et al., 2006). L'autophagie peut aussi réguler le transport et la dégradation des récepteurs GABA<sub>A</sub>. Deux membres de la sous-famille GABARAP, GABARAP et GABARAPL1, peuvent interagir avec la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> et participer à son transport à la membrane plasmique (Leil *et al.*, 2004; Mansuy *et al.*, 2004). En l'absence de molécules de

signalisation ou de neurotransmetteurs, les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont récupérés par endocytose et co-localisent avec les autophagosomes, probablement lors de la fusion de l'endosome et de l'autophagosome, conduisant ainsi à leur dégradation (Rowland et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggère que l'autophagie pourrait jouer un rôle important dans l'établissement et la fonction des réseaux neuronaux.

#### 1.4 L'homéostasie des axones

Dans les neurones, une accumulation de vésicules à doubles membranes, ressemblant à des autophagosomes, a été initialement identifiée à la suite d'expériences d'axotomie et d'excitotoxicité (Dixon, 1967; Matthews and Raisman, 1972). Plus récemment, une accumulation d'autophagosomes dans un modèle d'excitotoxicité, la souris *Lurcher* (dans laquelle le récepteur glutamate excitateur, GluR $\delta$ 2, possède une mutation le rendant constitutivement actif), a été démontrée au niveau des axones dystrophiques (Wang et al., 2006). L'importance de l'autophagie dans l'homéostasie de l'axone est évidente dans les souris déficientes pour l'autophagie dans le SNC. En effet, la perte du processus autophagique dans les neurones conduit à une dégénérescence axonale qui précède la mort neuronale (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2010). De plus, l'invalidation conditionnelle du gène *atg5* dans les neurones Purkinje chez les souris conduit à la dégénérescence progressive de ces cellules, précédé par une accumulation d'organites aberrants et de structures membranaires dans les terminaisons dystrophiques (Nishiyama *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent que l'autophagie joue un rôle indépendant des autres structures (*cell-autonomous*) dans l'homéostasie de l'axone. L'observation d'autophagosomes dans les axones, par contre, soulève plusieurs questions : à quel endroit et à partir de quel matériel ces autophagosomes sont-ils formés ? Comment sont-ils transportés aux lysosomes pour être dégradés ? Certaines études suggèrent que les autophagosomes pourraient être synthétisés *de novo* à partir de membranes provenant du réticulum endoplasmique lisse localisées dans les axones (Novikoff et al., 1971; Broadwell and Cataldo, 1984; Wang *et al.*, 2006; Maday et al., 2012). Ces autophagosomes pourraient alors se déplacer dans l'axone de manière antérograde ou rétrograde (Jahreiss et al., 2008; Maday *et al.*, 2012) puis ils seraient transportés vers le soma des neurones où ils fusionneraient avec les lysosomes grâce à l'intervention de la protéine dynéine (Komatsu et al., 2007; De Vos et al., 2008; Kimura et al., 2008). D'autre part, il a été montré que la protéine LC3, présente à la surface des autophagosomes, interagit

avec MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*) (Wang *et al.*, 2006). Cette protéine est présente en abondance dans les axones et joue un rôle important dans la régulation de la stabilité des microtubules (Gordon-Weeks and Fischer, 2000). La surexpression de MAP1B non-phosphorylée réduit le nombre d'autophagosomes marqués avec LC3 (Wang *et al.*, 2006). Il a donc été suggéré que MAP1B pourrait soit inhiber le processus d'autophagie dépendant de LC3, soit rapidement conduire les autophagosomes vers les lysosomes pour induire leur dégradation. L'expression de la forme phosphorylée de MAP1B (MAP1B-P) est importante dans les terminaisons d'axones dystrophiques où elle est associée aux autophagosomes positifs pour LC3 (Wang *et al.*, 2006). Les auteurs suggèrent que l'interaction entre LC3 et MAP1B ou MAP1B-P pourrait représenter deux différents modes de régulation de l'autophagie en condition normale ou pathologique.

## 2. L'autophagie neuronale induite

### 2.1 L'autophagie induite par la carence en nutriments

L'autophagie neuronale peut être induite chez la souris par une carence en nutriments suite à une privation de nourriture de 24 à 48 heures. Ces expériences, effectuées sur des souris GFP-LC3 montrent que l'autophagie peut être régulée différemment suivant les organes ou les tissus (Mizushima *et al.*, 2004). En effet, la carence en nutriments induit une accumulation d'autophagosomes et une augmentation de la conversion de la forme LC3-I en forme LC3-II dans le foie et le cœur, alors qu'aucune modification du flux autophagique n'a pu être observée dans le SNC dans les mêmes conditions (Mizushima *et al.*, 2004). Ces expériences ont été confirmées par des auteurs qui décrivent une absence de marquage ponctiforme d'ATG5 dans le cerveau de souris en conditions de carence alimentaire (Yue *et al.*, 2009). Ces études suggèrent que le cerveau pourrait être protégé contre la carence de nutriments grâce à l'utilisation d'autres sources d'énergie pour maintenir une fonction neuronale normale. Cette énergie pourrait provenir du glucose, des acides aminés ou d'hormones traversant la barrière hémato-encéphalique, mais aussi de nutriments et de facteurs trophiques produits par les cellules gliales au voisinage des neurones. Cependant, de récentes expériences *in vitro* démontrent que l'autophagie peut tout de même être induite par une carence de nutriments dans des neurones (Du *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2009; Kaushik *et al.*, 2011). Ce phénomène a aussi été confirmé *in vivo* par une étude utilisant des méthodes d'imageries pour détecter une augmentation d'autophagosomes ainsi qu'une

réduction d'activité de mTOR dans certaines régions du cerveau murin après 24 ou 48 heures de restriction alimentaire (Alirezaei et al., 2010). Ces résultats contradictoires peuvent en partie être expliqués par les différentes méthodes utilisées pour détecter les autophagosomes. Les premières expériences avec la souris GFP-LC3 ont mesuré l'état d'équilibre entre la synthèse et la dégradation des autophagosomes dans le cerveau sans ajout d'inhibiteurs de la dégradation par le lysosome. Ensuite, des expériences de cultures primaires neuronales avec les inhibiteurs des lysosomes ont étudié le flux autophagique par l'accumulation des autophagosomes (Boland et al., 2008). Ces expériences ont démontré l'importance de l'utilisation d'inhibiteurs des lysosomes dans l'étude du flux autophagique. Le manque de détection d'autophagosomes dans le SNC des souris GFP-LC3 était donc probablement une conséquence de la dégradation rapide des autophagolysosomes et non pas lié à une absence d'induction du flux autophagique.

## 2.2 Autophagie et neurodégénérescence

Les maladies neurodégénératives sont des maladies qui progressent en fonction de l'âge et qui sont caractérisées par la perte progressive de fonctions neuronales liées à la dégénérescence des neurones. Le pathogénèse des maladies neurodégénératives implique souvent le dysfonctionnement des mitochondries et l'accumulation d'agrégats de protéines (Jellinger, 2010). L'autophagie joue un rôle dans la dégradation des protéines malformées dans les maladies neurodégénératives et est dérégulée dans différentes maladies neurodégénératives (Wong and Cuervo, 2010). Par exemple, il existe une accumulation d'autophagosomes dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Nixon et al., 2005; Ma et al., 2010). De plus, une accumulation de la protéine p62 (une protéine liée à la formation d'agrégats de protéines ubiquitinylées quand l'autophagie est inhibée) dans les agrégats protéiques est observée dans de nombreuses maladies telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington (Komatsu *et al.*, 2007; Kirkin *et al.*, 2009; Yue *et al.*, 2009). L'induction de l'autophagie est souvent considérée comme un mécanisme de protection contre la neurodégénérescence grâce à son implication dans l'agrégation et la mitophagie. En effet, l'induction de l'autophagie réduit la sévérité des phénotypes liés aux modèles de la maladie de Huntington (Ravikumar et al., 2002) ou ceux de la sclérose latérale amyotrophique (Kabuta et al., 2006) en induisant la dégradation des agrégats de protéines liés à ces maladies.



### 2.3 Autophagie, stress mitochondrial et ROS

Les mitochondries sont des organites essentiels de la production d'énergie cellulaire car elles produisent la majorité de l'ATP cellulaire *via* le processus d'oxydation phosphorylante. Cependant, elles contribuent également de façon importante à la production des ROS cellulaires, produits secondaires de la chaîne de transport des électrons, pouvant causer des dommages mitochondriaux ou génomiques. Les ROS sont hautement réactives et destructives mais sont également des molécules de signalisation dans plusieurs processus intracellulaires, y compris l'autophagie (Finkel, 2003; Scherz-Shouval and Elazar, 2007; Scherz-Shouval and Elazar, 2011). En effet, plusieurs études ont démontré un rôle pour les ROS dans la mort et la survie cellulaire dépendantes de l'autophagie. Par exemple, la mort cellulaire autophagique est induite par un stress oxydatif lié à des traitements par des inhibiteurs de la chaîne de transport d'électrons tel que le TTFA (*thenoyl trifluoroacetone*), la roténone ou le 2-ME (*2-methoxyestradiol*) (Chen et al., 2007; Chen et al., 2008).

En revanche, les ROS peuvent aussi activer l'autophagie comme mécanisme de survie cellulaire, suite à la privation de nutriments par exemple (Scherz-Shouval et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que les ROS sont essentielles pour l'activation de l'autophagie car l'ajout d'anti-oxydants inhibe la formation des autophagosomes. De plus, ils ont montré que la protéase ATG4, enzyme jouant un rôle essentiel dans la maturation et dans la délipidation des protéines ATG8, peut être oxydée et inhibée par les ROS et en particulier par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette inhibition d'ATG4 joue principalement un rôle sur sa capacité à délipider les ATG8 et a pour conséquence de promouvoir la maturation des autophagosomes. Par ailleurs, la surexpression d'une forme mutante de la protéine ATG4D, localisée en permanence à la membrane mitochondriale, provoque une augmentation du niveau de ROS et de la mitophagie dans les érythroblastes humains différenciés (Betin et al., 2012). Les ROS sont aussi impliquées dans l'induction de l'autophagie observée dans un modèle murin de la sclérose latérale amyotrophique familiale (exprimant la protéine antioxydative mutée SOD1 [*superoxide dismutase 1*]) (Morimoto et al., 2007; Dobrowolny et al., 2008). Le contrôle de l'autophagie par les ROS cellulaires a également été démontré par l'exemple de la protéine TIGAR (*TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator*), une protéine connue pour diminuer les niveaux de ROS intracellulaires (Bensaad et al., 2006; Bensaad et al., 2009). En effet, l'inhibition de l'expression de TIGAR par siRNA augmente les niveaux de ROS et induit le processus autophagique.

Finally, mitochondrial stress inducing ROS accumulation can lead to mitophagy to eliminate damaged mitochondria. CCCP, an uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation, is a treatment often used to study mitophagy. In fact, CCCP induces autophagy by inhibiting the activity of mTORC1 independent of AMPK activation (Kwon et al., 2011) and induces LC3 conjugation to phospholipids and this mechanism depends on the protein ATG9 (Chen et al., 2013). More precisely, CCCP induces mitophagy dependent on the protein PARKIN, a process detailed previously (Narendra *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2010; Geisler *et al.*, 2010; Matsuda *et al.*, 2010). Mitochondrial depolarization by CCCP also induces mitophagy dependent on PARKIN in primary cortical neurons (Cai et al., 2012). Another protein involved in mitophagy induced by mitochondrial ROS is NIX. After treatment with CCCP, NIX is relocalized to the outer mitochondrial membrane to promote membrane depolarization as well as ROS production, ultimately leading to mTOR inhibition and autophagy activation (Ding *et al.*, 2010). This suggests that NIX is an early regulator of autophagy induced by CCCP.



# RESULTATS

---



## I RECHERCHE D'UN ANTICORPS ANTI-GABARAPL1 SPECIFIQUE

La forte identité de séquence et de structure entre les protéines de la famille GABARAP, et en particulier entre les protéines GABARAP et GABARAPL1 (86% d'identité entre ces deux protéines chez l'homme), rendent la détection spécifique de ces protéines difficile. De ce fait, l'expression de la protéine endogène GABARAPL1 dans les différents tissus ou lignées cellulaires par des techniques immunocytologiques a été très peu étudiée. Bien que le niveau d'expression de ces protéines puisse être étudié par la technique de western-blotting (puisque la protéine GABARAP migre plus rapidement que GABARAPL1 en gel SDS-PAGE), les laboratoires ont le plus souvent utilisé des systèmes de surexpression de protéines de fusion GABARAPL1 pour pouvoir étudier son rôle et sa distribution dans les différents tissus ou cellules étudiés.

Pour résoudre ce problème, nous avons recherché si un anticorps commercial pourrait détecter spécifiquement la protéine GABARAPL1. Nous avons donc étudié la spécificité des trois anticorps polyclonaux anti-GABARAPL1 développés par les sociétés ProteinTech Group et Chemicon et disponibles dans le commerce à cette époque. Ces anticorps étaient dirigés contre différents fragments de la protéine GABARAPL1 : un anticorps dirigé contre la partie centrale de la protéine (CHEM-CENT), un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la protéine (PTG-NTER) et un anticorps dirigé contre la protéine entière (PTG-FL). La spécificité de ces différents anticorps a été étudiée *in vitro* par western-blotting sur des lysats cellulaires et *in vivo* par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de souris. Les résultats de cette étude ont montré :

- l'importance de vérifier la spécificité des outils d'immunodétection commerciaux disponibles afin d'éviter toute interprétation erronée ;
- que l'affinité des différents anticorps commerciaux vis-à-vis des protéines GABARAP et GABARAPL1 était variable et que cela se répercutait sur l'analyse des niveaux d'expression de ces deux protéines lors des expériences de western-blotting ;
- que, dans les conditions utilisées, seul l'anticorps PTG-FL (dirigé contre la protéine GABARAPL1 entière) reconnaît du façon spécifique la protéine GABARAPL1 *in vitro* et *in vivo*.

Ces résultats sont décrits dans la publication suivante.



**PUBLICATION I : GABARAPL1 (GEC1) antibodies : target one  
protein, get one free !**

**Jaclyn Nicole Le Grand**, Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot, Pierre-Yves Risold and Michaël Boyer-Guittaut

*Autophagy* (2011) 7:11, 1-6.





# GABARAPL1 (GEC1) antibodies

## Target one protein, get one free!

Jaclyn Nicole Le Grand, Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot, Pierre-Yves Risold and Michaël Boyer-Guittaut\*

Université de Franche-Comté; Laboratoire de Biochimie; "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central"; U.F.R. Sciences et Techniques; Besançon, France

**Key words:** GABARAPL1, GEC1, GABARAP, LC3, autophagy, antibody

Atg8 is a yeast protein involved in the autophagic process and in particular in the elongation of autophagosomes. In mammals, several orthologs have been identified and are classed into two subfamilies: the LC3 subfamily and the GABARAP subfamily, referred to simply as the LC3 or GABARAP families. GABARAPL1 (GABARAP-like protein 1), one of the proteins belonging to the GABARAP (GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein) family, is highly expressed in the central nervous system and implicated in processes such as receptor and vesicle transport as well as autophagy. The proteins that make up the GABARAP family demonstrate conservation of their amino acid sequences and protein structures. In humans, GABARAPL1 shares 86% identity with GABARAP and 61% with GABARAPL2 (GATE-16). The identification of the individual proteins is thus very limited when working in vivo due to a lack of unique peptide sequences from which specific antibodies can be developed. Actually, and to our knowledge, there are no available antibodies on the market that are entirely specific to GABARAPL1 and the same may be true of the anti-GABARAP antibodies. In this study, we sought to examine the specificity of three antibodies targeted against different peptide sequences within GABARAPL1: CHEM-CENT (an antibody raised against a short peptide sequence within the center of the protein), PTG-NTER (an antibody raised against the N-terminus of the protein) and PTG-FL (an antibody raised against the full-length protein). The results described in this article demonstrate the importance of testing antibody specificity under the conditions for which it will be used experimentally, a caution that should be taken when studying the expression of the GABARAP family proteins.

### Introduction

*Gabarapl1/gec1* (*gabapap-like 1 protein/glandular epithelial cell 1*) is an estrogen-regulated gene that belongs to the *gabapap* (GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein) family of genes. It has been demonstrated that GABARAPL1 acts in receptor and vesicle transport thanks to its interaction with tubulin and the GABA<sub>A</sub> and kappa-opioid receptors.<sup>1,2</sup> GABARAPL1 also plays a role, like GABARAP, GATE-16 and LC3, in the process of autophagy and can be now considered as an autophagic marker as well.<sup>3</sup> The exact role of GABARAPL1 in intracellular transport and autophagy, however, is still unanswered, and will require further studies to address the remaining uncertainties. As with any experiment, the proper tools are critical to its success. As such, one essential technical question will have to be answered before the in vivo role of GABARAPL1, and similarly, the role of its closest homolog, GABARAP, can be elucidated: the question of the specificity of the currently available polyclonal anti-GABARAPL1 and anti-GABARAP antibodies. Indeed, we know that these two proteins share 86% identity at the amino-acid level (Fig. 1) and that the crystal structures of these proteins present identical tri-dimensional structures, similar to that of the ubiquitin protein.<sup>4-6</sup> These shared features make it very difficult to produce a

specific antibody directed against only one of these two proteins. Moreover, in humans, GABARAPL1 shows 61% identity with GATE-16,<sup>7</sup> 54% with yeast Atg8 (autophagy-related protein),<sup>8</sup> and 28.8% with MAP-LC3 (light chain 3 of microtubule associated protein).<sup>9-11</sup>

GABARAPL1 was first discovered in 1993 and described as part of the GABARAP family in 2001.<sup>12</sup> When performing a far from exhaustive search on PubMed, we counted about 31 publications citing this protein (using three different names: GEC1, GABARAPL1 or GABARAP-L1). Within these 31 publications, only nine presented antibody-detection of the GABARAPL1 protein. The majority of these publications examine the expression of *gabapap1* at the mRNA level.

Since the discovery of GABARAPL1 in our laboratory, we have endeavored to identify reliable tools to study this protein and have developed an appreciation for the technical problems linked to these tools. The main problem is that GABARAP and GABARAPL1 are so closely related (86% identity, Fig. 1) that their in vivo immunodistinction becomes very improbable. This problem can be easily circumvented when working with immunoblotting analysis. Although their calculated molecular weights are identical (14 kDa), GABARAPL1 displays a slower migration rate than GABARAP, allowing one to separate the two proteins with a

\*Correspondence to: Michaël Boyer-Guittaut; Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr

Submitted: 05/18/11; Revised: 07/18/11; Accepted: 07/20/11

DOI:

GABARAPL1	MKFQYKEDHPFEYRKKEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARVPDLDKRKYLVPSDLTVGQF	-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRSSEGEKIRKKYPDRVPVIVEKAPKARIGDLDKKKYLVPSDLTVGQF	-60
	QYKEDHPFEYRKKEG	KAPKARVPDLDKRKYLVPSDLTVGQF
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPE DALFFFVNN TIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDES SVYGK	-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAE DALFFFVNNVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDES VYGL	-117
	YFLIRKRIHLRPE DALFFFVNN TI	

**Figure 1.** Alignment of peptide sequences used to produce anti-GABARAPL1 antibodies with GABARAPL1 and GABARAP. The human amino-acid sequences (obtained from NCBI or GeneBank databases) of GABARAPL1 (NP\_113600) and GABARAP (CAG47031) proteins were aligned using the NCBI Protein BLAST tool. The amino acid sequences of the peptides used to produce anti-GABARAPL1 are highlighted in blue (PTG-NTER, Proteintech, 18721-1-AP) and in green (CHEM-CENT, Chemicon, AB15278). Variation between the GABARAP and GABARAPL1 proteins are shown in red.

higher percentage of acrylamide in the gel and a longer migration time.<sup>3,13</sup> Immunohistological analysis of the endogenous proteins, however, does not provide an easy alternative to the necessity of specific antibodies. Indeed, many researchers have encountered this problem of cross-reactivity with both their ‘homemade’ and commercially bought antisera and purified antibodies raised against either GABARAPL1 or GABARAP.<sup>1,2,14</sup> To our knowledge, there are no available antibodies that can differentiate between these two proteins, explaining why so many laboratories have chosen to use the less problematic mRNA-based techniques to overcome this problem and study the expression of these genes *in vivo*. While these studies have allowed for a better characterization and understanding of *gabarapl1* gene expression and regulation, they do not explore GABARAPL1 protein expression and regulation.

In the past, GABARAPL1 has been the subject of only a handful of studies, while most laboratories focused their efforts on other members of the GABARAP and LC3 families such as GABARAP, GATE-16 and LC3 as well as the yeast homolog, Atg8. Our recent paper establishing GABARAPL1 as a new autophagic marker, however, may trigger a new wave of research on this protein. The interest in GABARAPL1 functionality, in particular in the brain where it is the most highly expressed gene of the family,<sup>15</sup> is likely to grow in the future. Before that time comes, we wish to present several pieces of data explaining our concerns about the detection of the GABARAPL1 protein *in vitro* and *in vivo* in regards to its high homology with the GABARAP protein.

## Results

In this work, we studied three anti-GABARAPL1 antibodies among those that are commercially available: one directed against the full-length GABARAPL1 protein (PTG-FL, 11010-1-AP, Proteintech), a second raised against a short peptide sequence at the N-terminal of the protein (PTG-NTER, amino acids 4–18, QYK EDH PFE YRK KEG, 18721-1-AP, Proteintech) and a third raised against a longer peptide sequence in the center of the protein (CHEM-CENT, amino acids 35–84, KAP KAR VPD LDK RKY LVP SDL TVG QFY FLI RKR IHL RPE DAL FFF VNN TI, AB15278, Chemicon) (Fig. 1). All antibodies used are rabbit polyclonal antibodies. It is noteworthy that no monoclonal

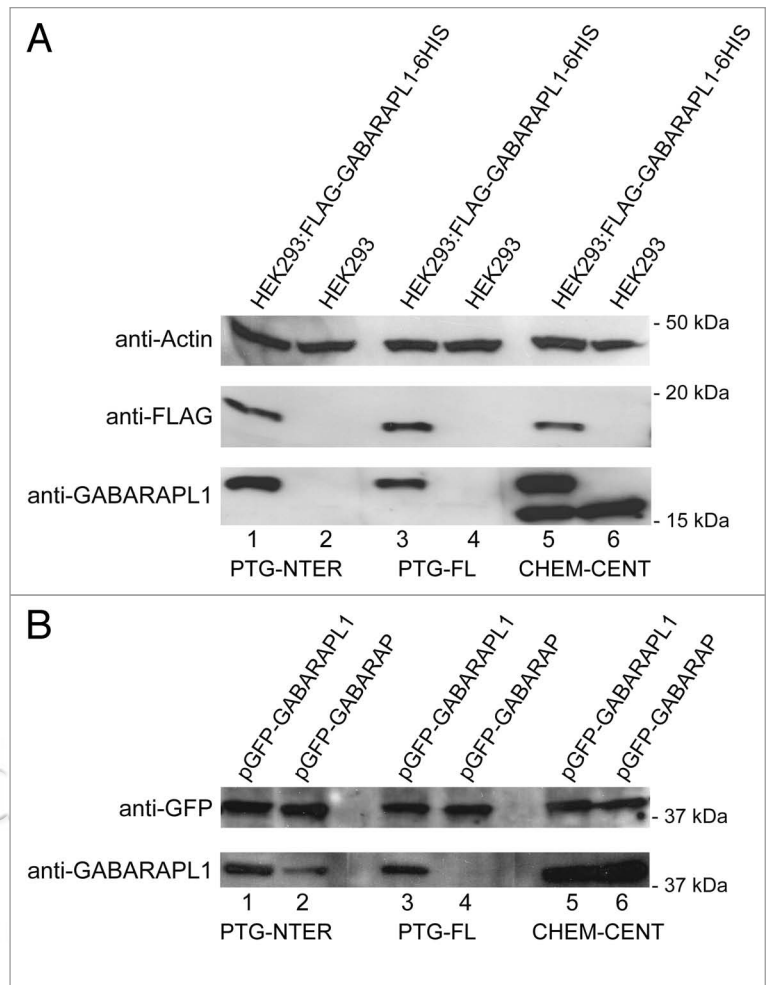
antibody directed against either GABARAPL1 or GABARAP is currently available.

To investigate the specificity of these antibodies against denatured GABARAPL1 and GABARAP, we performed protein gel blot analysis with HEK293 WT and FLAG-GABARAPL1-6HIS stably expressing HEK293 cell lysates (Fig. 2A). Antibodies directed against the FLAG peptide and Actin were used as internal controls of FLAG-GABARAPL1-6HIS protein expression and total amounts of loaded proteins, respectively. While these cell lines both express an easily detectable amount of GABARAP, endogenous GABARAPL1 expression is very weak, necessitating the use of the FLAG-GABARAPL1-6HIS stably transfected HEK293 cell line in order to more easily visualize GABARAPL1 in these lysates. All three antibodies tested displayed a relatively strong signal at approximately 18 kDa in size (Fig. 2A, lanes 1, 3 and 5), corresponding to FLAG-GABARAPL1-6HIS in the stably expressing cell line. In addition, the antibody raised against a central peptide of the GABARAPL1 protein (CHEM-CENT) revealed a second very intense band at approximately 15 kDa in size (Fig. 2A, lanes 5 and 6), corresponding to endogenous GABARAP. Surprisingly, despite the presence of a stably expressed recombinant GABARAPL1 protein this antibody produced a prominent band for the endogenous GABARAP protein, suggesting that this antibody equally recognizes the two proteins.

Given that protein-antibody interactions can vary depending on the amount of protein expressed, we chose to confirm these results with transient transfections of either GFP-GABARAPL1 or GFP-GABARAP prior to protein gel blot analysis of the protein lysates (Fig. 2B). An antibody directed against GFP was used as an internal control of the fusion proteins’ expression in the cells. In accordance with the previous results, the antibody raised against the central peptide (CHEM-CENT) displayed a 40 kDa band for both GFP-GABARAPL1 and GFP-GABARAP (Fig. 2B, lanes 5 and 6). In contrast, when GABARAPL1 and GABARAP are overexpressed, only one antibody of the two previously identified to be specific remained so. The antibody produced with the N-terminal peptide (PTG-NTER) detected both the GFP-GABARAPL1 and the GFP-GABARAP (Fig. 2B, lanes 1 and 2), suggesting that this antibody is not specific when both proteins are overexpressed. The antibody directed against the full-length peptide (PTG-FL), however, continued to identify only the GABARAPL1 protein (Fig. 2B, lane 3), producing only one signal corresponding to the

GFP-GABARAPL1. These results suggest that this antibody remains specific to GABARAPL1 whatever the levels of overexpressed proteins.

In order to examine the ability of these antibodies to discern between native GABARAPL1 and GABARAP, we performed liquid phase inhibition experiments followed by immunohistochemical analysis. Given the known high expression of *gabrarapl1* mRNA in the mouse brain and the fact that GABARAPL1 intervenes in the transport of neuronal receptors, we chose to conduct these studies on mouse cerebral sections. The respective antibodies were incubated alone or with either full-length recombinant FLAG-GABARAPL1-6HIS or FLAG-GABARAP-6HIS for two h prior to incubation on mouse coronal brain sections overnight followed by classical immunofluorescent detection methods. Staining intensity was then analyzed throughout the slice and representative images of three separate experiments were taken in the cortex. In the presence of the individual antibodies alone, the visible staining pattern varied from one antibody to another. The antibody raised against the full-length protein (PTG-FL) displayed the highest background and marked the cytoplasm of cells with a more intense vesicular staining within the cytoplasm as well as a fainter fiber-like staining pattern (Fig. 3A). The antibody raised against the N-terminal of the GABARAPL1 protein (PTG-NTER) displayed a similar staining pattern although the background staining was drastically reduced and fibril-like staining increased (Fig. 3D). Finally, the third antibody, raised against the central part of the GABARAPL1 protein (CHEM-CENT), displayed a much weaker signal in the cytoplasm of cells and a more prominent vesicular pattern throughout the section (Fig. 3G). After incubation with the FLAG-GABARAPL1-6HIS protein, all three antibodies were attenuated and little to no positive staining could be found in the corresponding sections, indicating that all three antibodies clearly recognize the GABARAPL1 protein in its native form (Fig. 3B, E and H). The results obtained from the incubation with the FLAG-GABARAP-6HIS protein, however, differed depending on the antibody in question. Incubation of the PTG-FL antibody with recombinant GABARAP did not appear to affect staining intensity at all (Fig. 3C), demonstrating that under the conditions used, this antibody is capable of distinguishing between GABARAPL1 and GABARAP. Incubation of the PTG-NTER antibody with recombinant GABARAP produced the exact opposite effect, with a complete attenuation of the visible signal on the corresponding tissue section (Fig. 3F). This was surprising since this antibody showed some specificity in protein gel blot experiments (Fig. 2). Finally, recombinant GABARAP, when incubated with the antibody produced by immunization with the central peptide (CHEM-CENT), reduced staining in the last experiment to about the same extent as incubation with recombinant GABARAPL1 (Fig. 3I). The two antibodies produced against peptide sequences within the GABARAPL1 protein were



**Figure 2.** Western blot analysis of anti-GABARAPL1 antibodies specificity. Western blot analysis of HEK293 and HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS cells (A) and HEK293 cells transiently transfected with a GFP-GABARAP or a GFP-GABARAPL1 vector (B). Whole cell lysates (20–40  $\mu$ g) were loaded on a 12% or 15% SDS-PAGE and protein gel blotting experiments were performed using three different anti-GABARAPL1 antibodies directed against the N-terminus (PTG-NTER), the full-length protein (PTG-FL) or the center of the protein (CHEM-CENT) and control antibodies (anti-GFP, anti-FLAG M2 and anti-Actin). A representative experiment of 3 performed is shown.

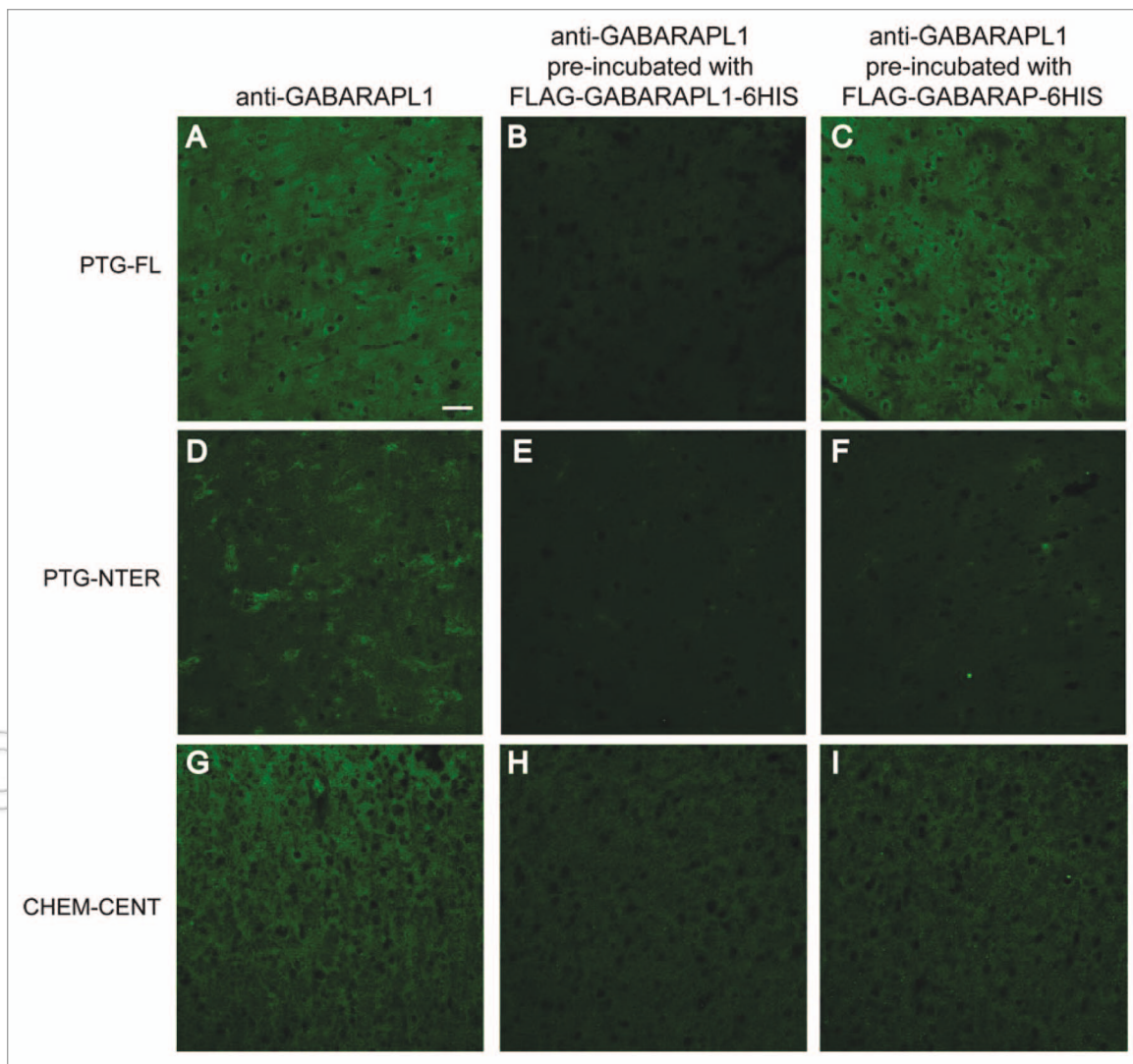
inhibited by incubation with recombinant GABARAP, suggesting that, under the conditions used, these antibodies also recognize this homolog protein.

## Discussion

In this work, we studied the characteristics of three different anti-GABARAPL1 antibodies in protein gel blot and immunohistochemical analysis. With the exception of the anti-ATG8L antibody from Protein Tech Group (PTG-FL), these antibodies are described to be specific to GABARAPL1, implying that they do not recognize the closest homolog, GABARAP.

Using HEK293 cell lysates, we demonstrated that the antibodies tested displayed differing affinities for the denatured forms of GABARAPL1 and GABARAP. Of the antibodies that





**Figure 3.** Immunohistochemical analysis of blocking protein experiments. Immunohistochemical analysis of rat brain tissue with anti-GABARAPL1 antibodies. One  $\mu$ l of pure anti-GABARAPL1 antibody was pre-incubated in either PBST alone, 0.5 nmol FLAG-GABARAP-6HIS in PBST or 0.5 nmol FLAG-GABARAPL1-6HIS in PBST for 2 h before incubation on rat brain sections overnight as described in the material and methods. Scale bar represents 20  $\mu$ m.

we chose, the antibody raised against a peptide sequence within the central part of the GABARAPL1 protein was the least efficient at discerning between the two proteins but, surprisingly, this antibody displayed a higher affinity for these proteins. Finally, the antibodies, raised against the N-terminus and the full-length protein, appear to be able to distinguish between the two homolog proteins under the conditions used. It is worth noting, however, that even these antibodies have, under other conditions, recognized the recombinant GABARAP protein in protein gel blotting experiments<sup>16</sup> and one must therefore be vigilant of the protocol used when using these antibodies for GABARAPL1 detection. Our protein gel blot experiments indicated that the PTG antibodies seem to be specific of GABARAPL1 but when we analyzed their specificity *in vivo*, we observed some differences. Indeed, when we pre-incubated each antibody with either GABARAP or GABARAPL1 before performing an immunohistochemistry staining on mouse brain sections, we observed that

only the PTG-FL antibody showed a specific staining, which was inhibited by a pre-incubation with the GABARAPL1 protein and not the GABARAP protein. All together, our results demonstrate that only the PTG-FL antibody seems to be specific of GABARAPL1 *in vitro* and *in vivo*.

In the past, our studies have utilized alternatives to endogenous protein detection such as mRNA expression or overexpression of a recombinant GABARAPL1, due to the lack of available antibodies. The identification of only one of the two homologs has been limited, making it difficult to associate the cellular roles being examined to one protein or the other. Although the conclusions obtained regarding the fundamental function of these two molecules in the cells remain valid, there is some doubt about the real implication of each of these proteins separately in the roles identified.

To conclude, experimenters should be very careful when working with anti-GABARAP and GABARAPL1 antibodies for

both in vitro and in vivo detection since they most likely cross-react and detect both proteins simultaneously. It would be judicious to either first demonstrate the degree of specificity of the antibody or intentionally target the two proteins together, as has previously been demonstrated for siRNA experiments.<sup>17</sup> In the future, the production of specific monoclonal antibodies would be more than useful to further characterize the function of each protein independently in vivo, as they have been described as playing an important role in various cellular and physiological processes such as apoptosis, autophagy, brain receptor transport or tumor progression.

## Materials and Methods

**Animals.** All animal care and experimental protocols adhere to the institutional guidelines. Cerebral tissue from an adult male Sprague Dawley rat was used for competing protein experiments.

**Vectors.** To construct the psBET-FLAG-GABARAP-6HIS and psBET-FLAG-GABARAPL1-6HIS vectors, *gabapap* and *gabapap1* cDNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the pcDNA3.1-*gabapap* and pcDNA3.1-*gabapap1*,<sup>18</sup> plasmids using the following primers: 5'-AAA TCT AGA ATG AAG TTC GTG TAC AAA GA-3' and 5'-TTT GGA TCC CAG ACC GTA GAC ACT TTC GT-3' for *gabapap* and 5'-AAA TCT AGA ATG AAG TTC CAG TAC AAG GA-3' and 5'-TTT AGA TCT CTT CCC ATA GAC ACT CTC AT-3' for *gabapap1*. The protocol used the following settings: 94°C for 2 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 54°C for 30 sec, and 72°C for 1 min and one final extension at 72°C for 10 min. The reactions were performed in a 25 µl volume containing 0.2 µM of each primer, 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 ng of template DNA and 1 U of Go Taq DNA Polymerase (Promega, M3171). The PCR fragments were then purified using the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, 740609.10) and ligated into the pGEM-T easy vector (Promega, A1360) using a T4 DNA ligase (Promega, M1801) according to the manufacturer's protocol. The *gabapap* and *gabapap1* cDNA were then digested with *Xba*I (Fermentas, FD0684) and BamHI (Fermentas, FD0054) or BglIII (Fermentas, FD0083), respectively and subcloned into the psBET-Flag/6His vector<sup>19</sup> to produce the psBET-FLAG-GABARAP-6HIS and psBET-FLAG-GABARAPL1-6HIS vectors, respectively. Plasmid sequences were confirmed by DNA sequencing using the previously described method in reference 20 (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

**Recombinant protein expression and purification.** BL21-DE3 *E. coli* transformed with psBET-FLAG-GABARAP-6HIS or psBET-FLAG-GABARAPL1-6HIS were grown in 100 ml Luria-Bertani (LB) broth in the presence of 100 µg/ml kanamycin at 37°C. Protein expression was induced with 0.5 mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) for 2 h. Bacteria were then pelleted at 5,000 g for 10 min at 4°C and resuspended in 5 ml of Sonication buffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.2–7.3, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 500 mM KCl, 10 mM Imidazole, 10 mM β-EtSH, 1 mg/ml lysozyme) per gram of bacteria. The bacterial solution was then incubated on ice for 30 min and sonicated three times for 15 sec (Sonic and Materials)

followed by a second centrifugation at 20,000 g for 30 min at 4°C to clear the lysates. The FLAG-GABARAP-6HIS and FLAG-GABARAPL1-6HIS recombinant proteins were then purified using a Ni-NTA Agarose column Purification System (Qiagen 30210) according to the manufacturer's protocol. Briefly, protein lysates were incubated with 500 µl of packed Ni-NTA resin per 500 ml bacterial culture for 2 h at 4°C. The resin was then centrifuged at 5,000 g for 5 min at 4°C and washed three times with at least two volume equivalents of Wash buffer [20 mM TRIS-HCl, pH 7.2–7.3, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 100 mM KCl, 20 mM Imidazole, 10 mM β-EtSH, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] followed by a centrifugation at 10,000 g for 1 min at 4°C. The purified protein was eluted by incubation with two volume equivalents of Elution buffer (20 mM TRIS-HCl, pH 7.2–7.3, 20% Glycerol, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 100 mM KCl, 10 mM β-EtSH, 0.5 mM PMSF) containing increasing concentrations of Imidazole (100–500 mM). Recombinant protein concentration was determined by comparison to a range of known BSA quantities on a 12.5% SDS-PAGE followed by Coomassie staining.

**Cell culture.** HEK293 (Human Embryonic Kidney) and HEK293:FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, PAA, E15-891) supplemented with 2 mM Stable L-Glutamine (PAA, M11-006), 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, 15140) and 10% fetal bovine serum (FBS, PAA, A15-101) in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. Transient transfection of the HEK293 cells plated in a 6-well plate was accomplished with 500 ng of either pGFP-GABARAP or pGFP-GABARAPL1 and 1 µl of TransFast reagent (Promega, E2431) per well, following the manufacturer's instructions.

**Tissue fixation and cryoprotection.** Animals were anaesthetized by an intraperitoneal (i.p.) injection of 7% chloral hydrate (ROTH, K318.3) and perfused as previously described in reference 21, with 0.9% NaCl followed by ice-cold 1% paraformaldehyde (PFA, ROTH, 0335.4) fixative in PBS (0.137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Extracted brains were subsequently post-fixed in 1% PFA for several hours at 4°C and cryoprotected by saturation in a 15% sucrose solution (Sigma, 17 994-9) at 4°C overnight. Tissues were frozen on dry ice in OCT (Tissue Tek 4583), sectioned into 10 µm sections at -20°C using a cryostat-microtome (Microm, HM560) and placed on gelatin-coated slides (ROTH, 4275.1) and stored at -40°C.

**Immunohistochemistry.** For immunohistochemical staining, slides were prepared by rehydrating in PBS-T (PBS with 0.3% Triton X100) for three 5-min washes at room temperature. Tissue was subsequently incubated with the appropriate primary antibody dissolved in milk diluant (PBS-T containing 1% bovine serum albumine, 10% lactoproteins and 0.01% sodium azide) overnight at room temperature. Primary antibodies used include: anti-ATG8L (PTG-FL, rabbit polyclonal, Proteintech, 11010-1-AP, 1:200), anti-GABARAPL1 (PTG-NTER, rabbit polyclonal, Proteintech, 18721-1-AP, 1:200), anti-GABARAPL1 (CHEM-CENT, rabbit polyclonal, Chemicon Millipore, AB15278, 1:200). Slides were then washed three times with PBS-T for 5 min each at room temperature before being incubated with the

appropriate secondary antibody diluted in milk solution for 1 h at room temperature. The secondary antibody used was the Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A11034, 1:800). Finally, the slides were washed with PBS-T three times for 5 min and coverslips were mounted with 70:30 glycerol:PBS-T.

**Competing protein experiments.** For immunohistochemical protein competing experiments, antibodies were incubated with either 0.05 or 0.5 nmol of purified recombinant protein (FLAG-GABARAP-6HIS or FLAG-GABARAPL1-6HIS) per 1  $\mu$ l of pure antibody (either anti-ATG8L from Proteintech at 0.247  $\mu$ g/ $\mu$ l, anti-GABARAPL1 from Proteintech at 0.773  $\mu$ g/ $\mu$ l, or anti-GABARAPL1 from Chemicon at 0.62  $\mu$ g/ $\mu$ l) diluted in PBS-T experiments for 2 h prior to detection experiments as described above.

**Confocal microscopy.** Tissue sections were examined with a fluorescence laser scanning confocal microscope Fluoview FV1000 BX (Olympus, France) and images were captured with a 40x/0.75 NA objective and a DP 75 numeric camera using the Fluoview FV1000 software (Olympus, France). All figures were assembled using Adobe Illustrator CS software.

**Western blot analysis.** Cells were lysed using the following lysis buffer: [50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, protease inhibitor cocktail (Sigma, P8340)]

then 20–40  $\mu$ g of cell lysates were resolved on a 12% or 15% polyacrylamide gel in running buffer (25 mM Tris base, 200 mM glycine and 0.1% SDS) at 120 V, using a Biorad Power Pack 1000. Proteins were transferred onto Immobilon-P PVDF 0.2  $\mu$ m membranes (Biorad, 1620177) for 1 h at 4°C at 100 V in protein gel blot transfer buffer (25 mM Tris base, 200 mM glycine and 10% methanol). Membranes were subsequently blocked in TBS-T (199 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 1.36 mM NaCl, 0.1% Tween 20) with 5% skim milk powder. Membranes were blotted with antibodies diluted in TBS-T supplemented with 0.5% skim milk against ATG8L (PTG-FL, rabbit polyclonal, Proteintech, 11010-1-AP, 1:2,000), GABARAPL1 (PTG-NTER, rabbit polyclonal, Proteintech, 18721-1-AP, 1:2,000), GABARAPL1 (CHEM-CENT, rabbit polyclonal, Chemicon Millipore, AB15278, 1:2,000), GFP (rabbit polyclonal, Millipore, AB3080, 1:5,000), FLAG M2 (mouse monoclonal, Sigma, F1804, 1:1,000) and Actin (rabbit polyclonal, Sigma, A5060, 1:3,000). The secondary antibody horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG was prepared in TBS-T containing 0.5% skim milk powder. Binding of antibodies to membranes was detected by Enhanced Chemiluminescence Plus Reagent (ECL Plus, GE Healthcare Life Sciences, RPN2132), according to the manufacturer's protocol.

## References

- Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:639-48; PMID: 15530441; DOI:10.1016/j.bbrc.2004.10.072.
- Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:7983-93; PMID: 16431922; DOI:10.1074/jbc.M509805200.
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:495-505; PMID: 20404487; DOI:10.4161/auto.6.4.11819.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB. Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* 2002; 33:63-74; PMID: 11779480; DOI:10.1016/S0896-6273(01)00558-X.
- Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:637-44; PMID: 12507496; DOI:10.1016/S0006-291X(02)02907-8.
- Stangler T, Mayr LM, Willbold D. Solution structure of human GABA(A) receptor-associated protein GABARAP: implications for biological function and its regulation. *J Biol Chem* 2002; 277:13363-6; PMID: 11875056; DOI:10.1074/jbc.C200050200.
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* 2000; 19:1494-504; PMID: 10747018; DOI:10.1093/emboj/19.7.1494.
- Lang T, Schaeffeler E, Bernreuther D, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M. Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J* 1998; 17:3597-607; PMID: 9649430; DOI:10.1093/emboj/17.13.3597.
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, et al. Cloning, expression patterns and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics* 2001; 74:408-13; PMID: 11414770; DOI:10.1006/geno.2001.6555.
- Mann SS, Hammarback JA. Gene localization and developmental expression of light chain 3: a common subunit of microtubule-associated protein 1A(MAP1A) and MAP1B. *J Neurosci Res* 1996; 43:535-44; PMID: 8833088; DOI:10.1002/(SICI)1097-4547(19960301)43:5<535::AID-JNR3>3.0.CO;2-J.
- Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* 1994; 269:11492-7; PMID: 7908909.
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adams P, et al. A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:118-25; PMID: 11374880; DOI:10.1006/bbrc.2001.4908.
- Chen C, Wang Y, Huang P, Liu-Chen LY. Effects of C-terminal modifications of GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem* 2011; 286:15106-15; PMID: 21388957; DOI:10.1074/jbc.M111.230896.
- O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H. GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* 2005; 22:2644-8; PMID: 16307606; DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04448.x.
- Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. Specific distribution of gabarap, *gec1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 2006; 1073:83-7; PMID: 16458273; DOI:10.1016/j.brainres.2005.11.004.
- Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, et al. Specific regional distribution of *gec1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2008; 1210:103-15; PMID: 18423580; DOI:10.1016/j.brainres.2008.02.077.
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 2010; 29:1792-802; PMID: 20418806; DOI:10.1038/emboj.2010.74.
- Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of gabarap1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:1024-31; PMID: 20197771; DOI:10.1038/sj.bjc.6605568.
- Schenk PM, Baumann S, Mattes R, Steinbiss HH. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs. *Biotechniques* 1995; 19:196-8; PMID: 8527135.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992; 24:104-8; PMID: 1422003.
- Brischoux F, Fellmann D, Risold PY. Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis. *Eur J Neurosci* 2001; 13:1733-44; PMID: 11359525; DOI:10.1046/j.0953-816x.2001.01552.x.

## II ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE GABARAPL1 DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL MURIN CHEZ L'ADULTE ET CHEZ L'EMBRYON

La protéine GABARAPL1 interagit avec plusieurs protéines impliquées dans le transport du récepteur GABA<sub>A</sub> y compris la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur, la tubuline, NSF et PRIP1 (Mansuy *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006) et participe ainsi au transport de ce récepteur à la membrane plasmique. Par ailleurs, GABARAPL1 interagit avec le récepteur aux  $\kappa$ -opioïdes et augmente son expression au niveau de la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2006). Ces deux récepteurs jouent des rôles essentiels dans le SNC et leur transport vers la membrane plasmique est essentiel au bon fonctionnement du SNC. A ce titre, la présence de GABARAPL1 dans le cerveau pourrait être indispensable à son bon fonctionnement.

L'importance d'un niveau basal de l'autophagie dans le système nerveux pour la maintenance de l'homéostasie des neurones a été démontrée dans des modèles de souris invalidées pour différents gènes impliqués dans l'autophagie dans le SNC (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2010). Dans ces modèles, une déficience en autophagie entraîne une neurodégénérescence accompagnée d'une accumulation de protéines ubiquitinylées et de la protéine p62. De plus, GABARAPL1 a été décrite pour interagir avec les protéines adaptatrices, telle que p62, pour faire le lien entre les substrats à dégrader et la membrane de l'autophagosome. Il est donc probable que cette protéine puisse jouer un rôle important dans l'homéostasie neuronale.

Des études antérieures menées au laboratoire, ont montré que le gène *gabapapl1* est plus exprimé que celui de *gabapap* dans le SNC et que son transcrite est le plus exprimé dans toutes les régions du cerveau murin (Nemos *et al.*, 2003; Mansuy-Schlick *et al.*, 2006). Alors que l'expression de l'ARNm *gabapapl1* a pu être étudiée par hybridation *in situ* dans le cerveau de rat adulte (Tolle *et al.*, 2008), l'absence d'un anticorps spécifique de la protéine GABARAPL1 rendait impossible la cartographie de son expression dans le cerveau.

En 2011, nous avons enfin identifié un anticorps spécifique anti-GABARAPL1 vendu par la compagnie ProteinTech Group (PTG-FL). Grâce à cet anticorps spécifique, nous avons réalisé une cartographie de l'expression de GABARAPL1 chez l'adulte et chez l'embryon murins. Nous avons aussi étudié, par western-blotting, l'expression de GABARAPL1 dans le



cerveau de l'embryon murin au cours du développement. Finalement, nous avons réalisé des co-marquages de GABARAPL1 avec différents marqueurs de populations de neurones afin d'identifier quelles populations cellulaires exprimaient cette protéine. Les résultats de cette étude ont montré que :

- l'expression de GABARAPL1 est détectée à partir du 11<sup>e</sup> jour du développement embryonnaire dans le cerveau murin et qu'elle augmente progressivement durant le développement ;
- chez l'embryon, GABARAPL1 est visible dans les neurones immatures ainsi que dans les fibres neuronales ;
- les variations d'expression de GABARAPL1 dans les différentes régions du cerveau sont détectables dès E14 ;
- chez l'adulte, cette protéine est exprimée dans toutes les régions du cerveau, du bulbe olfactif au tronc cérébral ;
- GABARAPL1 est exprimée uniquement dans les neurones chez l'adulte ;
- son expression apparaît faible et diffuse dans le cytoplasme avec un marquage ponctiforme plus intense ;
- dans les cultures primaires neuronales, GABARAPL1 co-localise avec p62 après inhibition de l'autophagie ;
- GABARAPL1 est fortement exprimée dans le cortex, quelques noyaux de la base, l'hypothalamus, les noyaux moteurs et les neurones dopaminergiques de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale ;
- GABARAPL1 est exprimée dans des inter-neurones (double marquage avec la calbindine et la parvalbumine) et dans des neurones à longues projections (double marquage avec l'acétylcholine transférase dans le pallidum, par exemple).

Ces résultats sont décrits dans la publication suivante.

**PUBLICATION II : Specific distribution of the autophagic protein  
GABARAPL1/GEC1 in the developing and adult mouse brain and  
identification of neuronal populations expressing GABARAPL1/GEC1**

**Jaclyn Nicole Le Grand**, Karine Bon, Annick Fraichard, Jianhua Zhang, Michèle Jouvenot, Pierre-Yves Risold, Michaël Boyer-Guittaut and Régis Delage-Mourroux

*PLoS One* (2013)



# **Specific distribution of the autophagic protein GABARAPL1/GEC1 in the developing and adult mouse brain and identification of neuronal populations expressing GABARAPL1/GEC1**

Jaelyn Nicole Le Grand,<sup>1</sup> Karine Bon,<sup>1</sup> Annick Fraichard,<sup>1</sup> Jianhua Zhang,<sup>2,3</sup> Michèle Jouvenot,<sup>1</sup> Pierre-Yves Risold,<sup>1</sup> Michaël Boyer-Guittaut<sup>1</sup> and Régis Delage-Mourroux<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biochimie, EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central », SFR IBCT FED 4234, U.F.R. Sciences et Techniques, Besançon, Doubs, France.

<sup>2</sup> Department of Pathology, Center for Free Radical Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA.

<sup>3</sup> Department of Veterans Affairs, Birmingham VA Medical Center, Birmingham, Alabama, USA.

\* Correspondance to: Pr. Régis Delage-Mourroux, Université de Franche-Comté, Laboratoire de Biochimie, EA3922, SFR IBCT FED 4234, UFR-ST, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France. Phone: 0033-3-81-66-66-24 ; Fax: 0033-3-81-66-69-70 ; Email: [regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr](mailto:regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr)

**Key words:** GABARAPL1, GEC1, GABARAP, LC3, autophagy

## Abstract

Macroautophagy is a highly conserved cellular degradation process, regulated by autophagy-related (atg) factors, in which a double membrane autophagosome engulfs cytoplasmic components to target them for degradation. In yeast, the Atg8 protein is indispensable for autophagosome formation. In mammals, this is complicated by the presence of six Atg8 homologues grouped into the GABARAP and MAP1LC3 subfamilies. Although these proteins share a high similarity, their transcript expression, regulation and protein interactions differ, suggesting they may display individual properties and specific functions. GABARAPL1/GEC1 is a member of the GABARAP subfamily and its mRNA is the most highly expressed Atg8 homologue in the central nervous system. Consequently, we performed an in depth study of GABARAPL1 distribution in the developing and adult murine brain. Our results show that GABARAPL1 brain expression is visible as early as embryonic day 11 and progressively increases to a maximum level in the adult. Immunohistochemical staining was detected in both fibers and immature neurons in embryos but was restrained to neurons in adult tissue. By E17, intense punctate-like structures were visible and these accumulated in cortical primary neurons treated with the autophagosome/lysosome fusion inhibitor Bafilomycin A1 (Baf A1), suggesting that they represent autophagosomes. Finally, GABARAPL1 expression was particularly intense in motoneurons in the embryo and in neurons involved in somatomotor and neuroendocrine functions in the adult, particularly in the *substantia nigra pars compacta*, a region affected in Parkinson's disease. Our study of cerebral GABARAPL1 protein expression provides insight into its role in the development and homeostasis of the mouse brain.

## Introduction

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy), a degradation process conserved from plants and yeast to higher eukaryotes [1], has been described to play an essential role in cellular mechanisms such as lifespan extension, cellular development and differentiation [2] as well as in the development of several diseases including cancer, Huntington's, Alzheimer's and Parkinson's diseases [3,4]. The yeast autophagy-related protein Atg8 is an ubiquitin-like modifier that localizes to and aids in the formation of autophagosomes [5,6]. In mammals, the *atg8* family is divided into two subfamilies based on when they intervene in autophagosomal formation, the *MAP-1c3* subfamily (*Microtubule-Associated Protein light chain 3 A, B and C*) and the *gabapap* subfamily (*gabapap* for *GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein*; *gabapap11/gec1* for *GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein like 1/glandular epithelial cells 1* and *gabapap12/gate16* for *GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein like 2/GTPase activating protein of 16 kDa*) [7]. The LC3 subfamily is involved in earlier events in the process of autophagosomal formation and is necessary for elongation of the double membrane vesicle, whereas the GABARAP subfamily is implicated in latter stages of autophagosomal formation and is necessary for the closure of the vesicle [7]. The members of these two subfamilies, although similar, differ in their expression patterns, transcriptional regulation, and affinity for different protein partners, suggesting that their contribution to the autophagic pathway and even their particular role may vary depending on the tissue type and condition. To date, two *atg8* knockout mice have been created: for *lc3 $\beta$*  [8] and *gabapap* [9]. Both knockout mice produce viable offspring and the *lc3 $\beta$*  knockout mouse displays no difference in its autophagic phenotype, suggesting that in the absence of one family member, there is compensation by another. It is not known if the same is true for the members of the GABARAP subfamily since autophagy levels were not assessed in the *gabapap* knockout.

*gabapap11/gec1*, one of the *gabapap* subfamily members, was originally discovered as an estrogen-regulated gene in guinea-pig glandular epithelial cells [10] and has since been identified as a member of the *gabapap* subfamily due to sequence similarity [11]. It is the most highly expressed transcript of the *atg8* mammalian homologues in the central nervous system [12,13] and its mRNA expression has been mapped out in the rat central nervous system in 2008 [14]. *gabapap11* mRNA expression varies throughout the rat brain, with a more abundant staining visible in neurons such as the pyramidal cells of the cerebral cortex and hippocampus, magnocellular neurons in the hypothalamus, purkinje cells of the cerebellum, and motoneurons in the brainstem and spinal cord, and a less expression visible in structures such as the striatum and the various reticular nuclei. In the same article, mRNA expression appeared to be limited to neurons, based on the lack of labelling in the fiber tracts and the morphology of the cells labelled in the gray matter.

At the protein level, GABARAPL1 expression has been identified by western blot analysis in different rat brain regions and confirmed in a few regions in which GABARAPL1 immunohistochemical labelling was visible such as the cortex, medial septal nucleus, diagonal band, hippocampus and motoneurons of the ventral horn [15]. In the latter study, authors used an antibody that appeared specific to GABARAPL1 in immunohistochemistry but that was not in immunoblotting techniques.

*gabap11* mRNA expression varies in different pathologies and following multiple stimuli. In the brain, a decrease in *gabap11* transcript levels have been observed in both the cortex of macaques treated with MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine), a neurotoxin which mimics the effect of the development of Parkinson's disease in animal models, and in the *substantia nigra* neurons of human Parkinson's patients [16,17].

We recently set out to study the specificity of several antibodies directed against GABARAPL1 and identified an antibody that is specific to the latter protein in both western blot and immunohistochemical experiments [18]. With this tool in hand, we have mapped out the protein expression of GABARAPL1 in the adult mouse brain and during the development. Our results demonstrate a protein expression throughout the adult mouse brain similar to the *gabap11* mRNA distribution previously described in rat. During development and in the adult mouse, GABARAPL1 is distributed throughout the brain, from the olfactory bulb to brainstem, with varying intensity. Although GABARAPL1 is found only in neurons in the mature brain, it is also observed in fiber tracts during neuronal development. At a cellular level, GABARAPL1 displays a weak cytoplasmic and sometimes dendritic staining with stronger intensity punctate structures clustered within the cytoplasm. These structures are increased in the presence of a drug that inhibits the autophagy flux and the majority co-localizes with the specific autophagic substrate p62, suggesting that they are indeed autophagosomes. GABARAPL1 staining was observed in long projection neurons and interneurons, and co-localized with antibodies against choline acetyl transferase (ChAT), the dopaminergic transporter (DAT), calbindin and parvalbumin. This study describes for the first time the expression of an autophagic protein, GABARAPL1, in the mouse brain and during its development. Our data demonstrate that this expression is not ubiquitous and shows high differences throughout the mouse brain. These data suggest that the basal autophagy levels might vary in the different types of neurons at different stages of their life and that this process might be highly regulated.

## Materials and Methods

### Animals

Cerebral tissues from wild type (WT) embryo, WT adult male mice and GABARAP<sup>-/-</sup> adult male mice were used for GABARAPL1 protein expression mapping. WT Swiss mice were obtained from Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France. GABARAP<sup>-/-</sup> 129/SvEv-C57BL/6 mice were kindly provided by Pr. Heinrich Betz, Department of Neurochemistry, Max-Planck-Institute for Brain Research, Frankfurt, Germany. The time of conception for embryos was documented by vaginal plug observation (embryonic day 0, E0). Timed pregnant mice and adult male mice were euthanized by cervical dislocation. Mice pups at E11, E12, E13, E14 and E17 were sacrificed by decapitation.

### Tissue fixation and cryoprotection

Adult male mice were perfused as previously described [19] with 0.9 % NaCl followed by ice- cold 1 % paraformaldehyde (PFA, ROTH) fixative in PBS (0.137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). For immunohistochemistry experiments, extracted adult and embryonic brains were post-fixed in 1 % PFA for several hours at 4°C and cryoprotected by saturation in a 15 % sucrose solution (Sigma, 17 994-9) at 4°C overnight. Fresh tissue contained within an Eppendorf tube (for western-blotting experiments) or cryoprotected tissue (for immunohistochemistry experiments) was frozen by immersion in isopentane using the Snap-Frost™ system (Excilone, France), sectioned™ at -20°C into 10 µm sections using a cryostat-microtome (Microm), placed on gelatin-coated slides (ROTH) and stored at -40°C.

### Immunohistochemistry

For immunohistochemical staining, slides were prepared by rehydration in PBS-T (PBS with 0.3 % Triton X100) for three 5 min washes at room temperature. Tissue was subsequently incubated with the appropriate primary antibody dissolved in milk diluant (PBS-T containing 1 % bovine serum albumine, 10 % lactoproteins and 0.01 % sodium azide) overnight at room temperature. The primary anti-GABARAPL1 specific antibody used was anti-ATG8L (rabbit polyclonal, Proteintech, 11010-1-AP, 1:500) [18]. Slides were then washed three times with PBS-T for 5 min each at room temperature before being incubated with the appropriate secondary antibody diluted in milk solution for 1 h at room temperature. The secondary antibody used was the Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, 1:800). Finally, the slides were washed with PBS-T three times 5 min and cover slips were mounted with 70:30 glycerol:PBS-T.



## Immunostaining of mouse embryonic cortical primary neurons

Dissected cortices from 8 embryos were resuspended in 5 ml of HBSS (Invitrogen) and then incubated with 26 U/ml of Papain (Worthington) for 20 min at 37°C. After addition of 2 ml of NBM+ medium (Neurobasal medium, X B27, 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin, 0.5 mM L-Glutamine, Invitrogen), the cortices were grounded and centrifuged for 5 minutes at 1000 g. The pellet was then resuspended in 2 ml of complete NBM+ medium and 500 µl were loaded on 2 ml of a 4 % BSA solution before a centrifugation step at 1000 g for 5 min to remove debris. The pellet was then resuspended in 2 ml NBM+ medium and the cell concentration determined before plating on coverslips in 24 well plates at a concentration of  $2 \cdot 10^5$  cells per well. The primary neurons were then cultured in an incubator at 37°C in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere for 7 days with half the medium changed on day 2 and 5. On day 7, half of the medium was replaced with fresh medium with or without Baf A1 (Sigma) at a final concentration of 100 nM and incubated for a further 16 h. The cells were then washed once in PBS and fixed for 45 min in a 4 % PFA solution in PBS. Cells were then washed twice in PBS and subsequently permeabilized for 3 min in a 0.5 % Triton-X-100 solution in PBS, washed four times with PBS, blocked for 1 h in 3 % BSA in PBS and then incubated overnight at 4°C with the anti-ATG8L (rabbit polyclonal, Proteintech, 11010-1-AP, 1:500), anti-p62 (mouse monoclonal, Abnova, 1:500), anti-GFAP (rabbit polyclonal, Dako, 1:500) and the anti-NeuN antibody (mouse monoclonal, Millipore, 1:500) dissolved in blocking buffer. Coverslips were then washed three times with PBS for 5 min each at room temperature before being incubated with an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, 1:500) and an Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, 1:500) diluted in PBS for 1 h at room temperature in the dark. Finally, the cells were washed four times 5 min with PBS, incubated with a 2 µg/ml Hoescht solution in PBS for 10 min at room temperature, washed once in PBS and coverslips were mounted on slides in Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates, Inc).

## Microscopy

Fluorescent tissue sections were examined with either a fluorescent microscope (BX51, Olympus, France), a fluorescence laser scanning confocal microscope (IX81, Olympus, France, SFR IBCT FED 4234 microscopy core Besançon, France) or a Zeiss LSM 710 confocal microscope (UAB microscopy core, Birmingham, AL, USA). Images were captured with either a DP50 or DP75 numeric cameras (Olympus, France) using the Fluoview FV1000 software, AnalySIS3.1 software (Soft Imaging System) or Zen 2008 software, respectively. All figures were assembled using Adobe Photoshop CS2 and Adobe Illustrator CS software.

## Western blot analysis

Brain tissue was ground and lysed using the following lysis buffer: [10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % NP-40, 1 % Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Sigma, P8340)] then 40 µg of tissue lysates were resolved on a 15 % polyacrylamide gel in running buffer (25 mM Tris base, 200 mM glycine and 0.1 % SDS) at 20 mA using a Biorad Power Pack 1000. Proteins were transferred onto Immun-Blot PVDF 0.2 µm membranes (Biorad) for 1 h at 4°C at 200 mA in Western Blot transfer buffer (25 mM Tris base, 200 mM glycine and 10 % methanol). Membranes were subsequently blocked in TBS-T (199 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.36 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) with 5 % skim milk powder. Membranes were blotted in TBS-T supplemented with 0.5 % skim milk and anti-ATG8L (rabbit polyclonal, Proteintech, 1:1000) and anti-Actin (rabbit polyclonal, Sigma, 1:3000). The secondary antibody horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit IgG was prepared in TBS-T containing 0.5 % skim milk powder. Binding of antibodies to membranes was detected by Enhanced Chemiluminescence Plus Reagent (ECL Plus, GE Healthcare Life Sciences), according to the manufacturer's protocol. . Image Lab software (Bio-Rad Laboratories) was used to quantify protein band density.

## Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using a Student's t test on GraphPad PRISM® software. Data are expressed as the mean ± SEM, \*\*p<0.05 versus E11, \*p<0.1 versus E11 (n=3).

## Ethics Statement

The appropriate institutional ethics committee approved all experiments in this study. All animal care and experimental protocols adhere to the institutional guidelines and are in compliance with the University of Alabama at Birmingham and the University of Franche-Comte Institutional Animal Care and Use Committee guidelines.

## Results

### Anti-GABARAPL1 antibody specificity and staining

Since GABARAPL1 shares a very high sequence identity (86 % in the case of the human proteins) with its closest homologue GABARAP, we used the only specific anti-GABARAPL1 antibody, to our knowledge, available on the market for our study. This antibody from Proteintech is specific of GABARAPL1, not only in western blot but also in immunohistochemistry experiments [18].

At a cellular level, GABARAPL1 localization is displayed as weak labelling throughout the cytoplasm and some neuronal extensions with brighter punctate labelling within the cell body (Fig. 1a in adult and 12d in embryo). This pattern is observed in all the labelled neurons throughout the adult brain, but is more prominent at E17 than E11 in the embryonic brain. This localization is similar to the one observed previously in cellular overexpression models [20,21] and is consistent with its previously described roles in receptor transport and the formation of autophagosomes.

Although our study was performed using the same antibody lot previously demonstrated to be specific to GABARAPL1, we nevertheless took supplementary precautions to confirm the specificity of the staining observed. Firstly, we performed *in-situ* hybridization on the preceding slide in the wild type adult or embryonic mouse series with a probe recognizing a 3'-UTR region of *gabarapl1* mRNA whose specificity has been previously confirmed [14]. These experiments allowed us to correlate the mRNA *gabarapl1* expression to its protein expression in the same region (Fig. 1b-c). Secondly, we studied the expression of GABARAPL1 in the GABARAP knockout mouse to confirm its distribution pattern. To do so, we performed immunohistochemical experiments, using the same GABARAPL1 antibody, on a series of coronal sections produced from a GABARAP knockout mouse or GABARAP knockout embryos and verified the features of the staining produced in the different regions examined in the wild type mouse brain. In all the regions examined, the GABARAPL1 staining pattern was found to be the same as the one observed in the wild type animals (Fig. 1d-e).

### GABARAPL1 expression in embryonic cortical primary cultures

The GABARAPL1 labeling pattern in the whole adult brain revealed that this protein, like its mRNA, is found predominantly in the grey matter and thus likely only within neurons. In order to confirm the neuronal expression of GABARAPL1, we utilized mouse embryonic cortical primary cell cultures to study GABARAPL1 staining in an *ex vivo* model. We performed immunocytofluorescence experiments with our specific anti-GABARAPL1 antibody and a marker of neuronal cell types, anti-NeuN (neuronal nuclei), or a

marker of glial cells, anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein), on primary cell cultures grown in either neurobasal media (NBM, Fig. 2a-d) or Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% FBS (DMEM, Fig. 2e-h), producing primarily neuronal or glial cell cultures, respectively. In both *ex vivo* models, all GABARAPL1 positive cells were also positive for NeuN. Consistent with the small percentage of neuronal cells in these cultures, very little GABARAPL1 staining was visible in the DMEM grown cultures (predominantly glial cells). Together, these results demonstrate that GABARAPL1 protein expression is found primarily in neurons.

Since GABARAPL1 has been previously described to be involved in receptor transport in neurons [21,22] and to be associated with autophagic vesicles [20], the punctate staining observed in the neurons of the mouse brain is most likely associated with secretion or autophagic vesicles. Previously published studies have demonstrated that the visualisation of autophagic proteins such as p62 or LC3 in the normal brain is difficult. Indeed, these studies describe a lack of p62 or punctate LC3 staining in normal brain tissue [23,24,25]. Like these other studies, we were unable to identify p62 labeling or LC3 punctate labeling in the mouse brain tissue. As such, we performed co-labeling experiments in primary neuronal cultures. To determine whether GABARAPL1 is linked to autophagic vesicles in neurons, we incubated the primary cultures in the presence of Baf A1, a described inhibitor of the autophagic flux, allowing the accumulation of autophagic vesicles in the cells [26]. Like the *in vivo* staining described earlier, GABARAPL1 displayed a weak cytoplasmic and a stronger punctiform staining in primary neuron cultures (Fig. 3b). When the autophagic flux is blocked with Baf A1, we observed an increase in the number of GABARAPL1-positive vesicles in the cells (Fig. 3e), suggesting that the punctiform staining observed in these neurons, and therefore in the mouse brain, is most likely linked to autophagic vesicles. We then stained these primary neuron cultures with an anti-p62 antibody. p62 has been described as a protein specifically degraded through the autophagosome/lysosome pathway and shown to accumulate in autophagosomes in presence of BafA1 [27]. As seen in Fig. 3g-i, in control cells, GABARAPL1 and p62 staining are diffuse throughout the cytoplasm with some more intense vesicle staining and we observe little co-localization. Conversely, when the cells are incubated with BafA1 (Fig. 3j-l), we observe an increase in the number of these vesicles and an accumulation of the two proteins in most, but not all, of these structures. We can therefore conclude that the GABARAPL1 staining observed in mouse neurons is primarily linked to autophagosomal structures.

## Distribution of GABARAPL1 protein in the adult brain

The protein expression of GABARAPL1 in the brain mapped out in this study describes an expression pattern congruent with that of its mRNA [14]. We confirmed that the GABARAPL1 protein is

abundantly expressed in the brain from the olfactory bulb to the brainstem. GABARAPL1 distribution, however, was not uniform throughout the brain and the intensity of labelling varied in labelled cells. A detailed list of the specific brain regions labelled with the anti-GABARAPL1 antibody is displayed in Table 1. Cells found to be positive for GABARAPL1 were designated by a relative level of staining from 0 to +++ based on their intensity. Examples of intense (Fig. 4a-b), moderate (Fig. 4c-d) and weakly (Fig. 4e-f) labelled cells can be seen in Figure 3.

### *Telencephalon*

GABARAPL1 expression was observed throughout the telencephalon, like its mRNA, with a higher expression found in the cerebral cortex and moderate to weak expression observed in most of the basal nuclei with the exception of the magnocellular preoptic and medial septal nuclei and the nucleus of the diagonal band, in which very intensely labelled cells were observed. GABARAPL1 protein distribution within the telencephalon is depicted in Fig. 5a with representative images of staining in the cerebellar cortex (Fig. 5b), the striatum (Fig. 5c), and nucleus of the diagonal band (Fig. 5d).

Within the telencephalon, GABARAPL1 expression was identified in cholinergic neurons visible in the cerebral cortex (ChAT-positive cells, Fig. 6a-c) the striatum and the pallidum as well as calbindin and parvalbumin-positive cells in the striatum (Fig. 6d-i).

### *Diencephalon*

GABARAPL1 protein distribution within the diencephalon is depicted in Fig. 7a. GABARAPL1 expression could be seen throughout the diencephalon with varying intensities. Except for the anterodorsal nucleus of the thalamus (AD), (Fig. 7b), the thalamus was only weakly to moderately stained with anti-GABARAPL1. GABARAPL1 expression was overall higher in the hypothalamus, particularly in the paraventricular nucleus (PVH) (Fig. 7c), the medial preoptic nucleus, the medial mammillary nucleus and the lateral hypothalamus area (Fig. 7a). Double staining with anti-ChAT and anti-GABARAPL1 revealed that all cholinergic neurons within the diencephalon were GABARAPL1 positive.

### *Mesencephalon*

Weak to moderate staining was observed throughout most regions of the mesencephalon with the exception of some stronger labelling (Fig. 8a). In particular, the ventral tegmental area (VTA, Fig. 8b) and *substantia nigra* (SN, Fig. 8c) expressed a higher level of GABARAPL1. Interestingly, the GABARAPL1 expression observed in the *substantia nigra* was particularly intense in the *pars compacta* region compared to the *pars reticula* region. Double staining in these regions revealed that GABARAPL1 is found in neurons

that express the dopamine transporter (DAT, Fig. 6j-l). Moderate labelling in the pyramidal layer of the hippocampal formation is depicted in Fig. 7d.

### *Rhombencephalon*

GABARAPL1 labelling in the hindbrain was the strongest in the motor nuclei (Fig. 9a), in particular in the purkinje cells within the cerebellum (Fig. 9b), in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMX) (Fig. 9c) and in the hypoglossal nucleus (XII) (Fig. 9d).

## GABARAPL1 expression throughout development

GABARAPL1 protein expression was detectable in whole head embryonic tissue by western blot analysis as early as embryonic day 11 (E11), after which it increased progressively throughout development, reaching a value six fold higher at E17 than at E11 (Fig. 10). However, expression levels of GABARAPL1 at E17, shortly before birth, were significantly inferior to GABARAPL1 expression in the adult mouse brain.

In accordance with western blot results, GABARAPL1 staining was present at E11 to E17 throughout the developing brain from the telencephalon to the brainstem (Fig. 11, 12, 13). GABARAPL1 labelling became ubiquitous throughout the brain as the mantle layer differentiated. This labelling was visible throughout the mantle layer in the pallium but never in the neuroepithelial layer of the developing brain (Fig. 11a, b 12c and 13a-b). This result is in accordance with the presence of GABARAPL1 in immature neurons.

During earlier developmental stages (E11/E12) cells in the mantle layer were uniformly labelled for GABARAPL1 (Fig. 11a, b). Differential patterns of GABARAPL1 labelling only started to become visible at intermediate stages (E14, Fig. 12) and were more obvious at later stages (E17, Fig. 13), at which point the adult expression pattern appeared to develop. This differential pattern similar to the adult was particularly evident in the motoneurons, such as surrounding the 4<sup>th</sup> ventricle in the brainstem (Fig. 12d, Fig. 13e, f). In the pallium, organized layers of GABARAPL1 labelling were visible, in which the intermediate zone and cortical plate strongly expressed the GABARAPL1 protein (Fig. 12c or 13a, b).

Contrary to the adult mouse, we also observed a labelling of fibers in the embryo as is visible in the pyramidal tract at E11 (Fig. 11c), the posterior commissure at E14 (Fig. 12a, b) and the optic tract at E17 (Fig. 13 c). Fiber labelling with the anti-GABARAPL1 was also demonstrated in the intermediate zone of the cortical plate, which gives rise to the corpus callosum (Fig. 12c, 13a, b).

At a cellular level, GABARAPL1 labelling appeared diffused throughout the cell at earlier stages of development and, as mentioned before, only showed signs of the stronger punctate-like structures visible in the cytoplasm at later stages, around E17 (Fig. 13d).

## Discussion

Our study is the first to map out the differential expression of the GABARAPL1 protein in the adult and developing embryonic murine brain. In this study, we confirmed the strong presence of this protein throughout the brain, visible in immature neurons and fibers during differentiation and in mature neurons in the adult.

Immunohistochemical labelling with a specific anti-GABARAPL1 antibody revealed an overall similar distribution in the adult of the mouse GABARAPL1 protein compared to that of the rat *gabapll* mRNA [14], suggesting that in this case, mRNA levels do depict protein levels. Examples of these coherences include the cerebral cortex, which was strongly labelled in both studies, and the pallidum, which was weakly labelled in both studies. The similar distribution of *gabapll* mRNA and protein is particularly evident through the labelling pattern of the *substantia nigra*, in which the *pars compacta* was particularly strongly labelled with both the *gabapll* mRNA probe [14] and the GABARAPL1 protein specific antibody, while the *pars reticula* remained less strongly labelled in both cases.

Despite the overall similar distribution between the GABARAPL1 protein and its mRNA, some variations were observed. These differences are due either to a difference between mRNA and protein expression levels or between species. For example, in the telencephalon, the relative protein expression of GABARAPL1 was found to be lower than its relative mRNA levels in the main olfactory bulb, the anterior olfactory nucleus, the fundus of the striatum and the bed nucleus of the accessory olfactory tract.

A few dissimilarities were visible between the two species: rat and mouse. *gabapll* mRNA expression in the induseum griseum of the cortex and certain regions of the diencephalon varied. In the induseum griseum, intense mRNA staining was observed in the rat and weak mRNA staining, associated with weak to moderate protein expression, were observed in the mouse. The mRNA expression and corresponding protein expression of GABARAPL1 in the mouse was found to be weak in several sensory nuclei of the thalamus as well as in the *zona incerta*, and several hypothalamic nuclei compared to a higher expression observed in the rat. On the other hand, *gabapll* expression appeared to be higher in the mouse anteroventral periventricular hypothalamic nucleus compared its expression in the rat. Lastly, we also observed a lower expression of *gabapll* in the mouse interstitial nucleus of Cajal and the nucleus of Darkschewitsch and a higher expression in the external cuneate nucleus compared to the mRNA expression in the rat.

What was particularly interesting in the adult was the strong expression of GABARAPL1 restricted to neuronal cells. Since GABARAPL1 is an important effector of the autophagic process, and autophagy is a globally important cellular process, one would expect to still see some labelling in the surrounding cells. This

difference could be explained by the higher importance of housekeeping autophagy in post-mitotic cells, such as neurons, compared to their surrounding supporting cells, such as glia. Not only did GABARAPL1 display a differential expression between different cells types, but its expression also varied in different brain regions. By use of double labelling with different antibodies, we demonstrated that GABARAPL1 is expressed in different types of neurons, including both GABAergic (calbindin and parvalbumin positive neurons in the pallidum) and glutamatergic (pyramidal cells of the cortex) neurons. Double labelling experiments with an anti-DAT also revealed that GABARAPL1 punctate staining was strong in dopaminergic neurons throughout the *substantia nigra* as well as the ventral tegmental area. While GABARAPL1 was present in different neuronal types, the level of its expression varied from one region to another. For example, GABARAPL1 labeling was visible in the GABAergic Purkinje cells but absent from the glutamatergic granule cells of the cerebellum. GABARAPL1 labeling was also visible in the pyramidal and granular layers (containing excitatory neurons) of the hippocampus and dentate gyrus but not in the molecular layers (composed of inhibitory interneurons). More detailed studies of GABARAPL1 expression with respect to the organization of specific brain regions combined with functional approaches will therefore be interesting for future studies.

To date, no other mammalian Atg8 protein homologue has been mapped out in the adult brain, although their mRNA expression levels have been observed [13,14]. As such, protein mapping of the other members of the GABARAP and LC3 families in the brain would be very interesting in order to determine if there is a compensation of the other members in the cells in which GABARAPL1 is less strongly expressed. This map of basal levels of GABARAPL1 in the brain is also a valuable tool that can be used to compare GABARAPL1 protein levels under different conditions such as neurodegenerative models using different chemical molecules, experimentation methods or knockout models, such as the neuronal specific *atg5* and *atg7* mouse knockout models [28,29].

In the embryo, similar GABARAPL1 distribution patterns compared to the adult became visible at E14 and even more pronounced at E17, at which point neuroblast expression of GABARAPL1 corresponded to the adult expression of this protein. Unlike in the adult, however, GABARAPL1 staining was also observed in both fibers. In particular, a strong signal was detected in fiber tracts at E11, suggesting a role for GABARAPL1 in axonal growth and elongation during development. Indeed, GABARAPL1, like GABARAP [30] and LC3 [31], is a microtubule-associated protein known to bind to tubulin and promote tubulin assembly and microtubule bundling [22] and, therefore, most likely plays an important role in axon and dendritic projection during development. Contrary to the mantle layer, no labelling in the neuroepithelium was visible, suggesting that GABARAPL1 does not play a role in stem cells surrounding the ventricles.



*lc3 $\alpha$*  and *lc3 $\beta$*  mRNA expression have also been examined in the developing murine central nervous system [8]. In these studies, the authors demonstrate identification of *lc3 in-situ* staining in the forebrain, midbrain and commissural neurons of the developing dorsal neural tube, similar to the expression we observed for the GABARAPL1 protein.

In the adult and later stages of development, GABARAPL1 labelling displays a weak signal in the cytoplasm and some neuronal extensions with brighter punctate structures throughout the cytoplasm and a complete absence of labelling in the nucleus. This staining is consistent with the GABARAPL1 distribution we have previously observed in our *in vitro* models when studying the role of GABARAPL1 in autophagy [20]. The importance of a basal amount of autophagy in neurons has been demonstrated by the two conditional knockouts: *atg5*<sup>-/-</sup> and *atg7*<sup>-/-</sup> [28,29]. In both these mouse models, a deficiency in autophagy in the central nervous system resulted in severe neurodegeneration. As such, one would expect to see a basal level of autophagy visible in the murine brain, suggesting that the punctate structures visible with our GABARAPL1 staining likely, at least partially, represent autophagosomal membranes. Indeed, primary cortical cultures (E17) incubated with or without Baf A1, an inhibitor of the autophagic flux described to inhibit the fusion of autophagosomes with lysosomes, revealed a significant increase in the number of intracellular vesicles positive for GABARAPL1 and/or p62, a described substrate of autophagy. These *ex vivo* data demonstrate that GABARAPL1 is, at least partially, associated with autophagosomes in primary neurons and consequently in the mouse brain.

Nonetheless, some vesicles are positive for both proteins while others are only positive for GABARAPL1 or p62. The p62 only positive vesicles are likely to be autophagosomes containing none or little GABARAPL1. Indeed, we are aware of the existence of 6 members of the Atg8 family, most of which are expressed in neurons to different extents, and it is still unknown if they all participate in the formation of each autophagosome or, more likely, if they are specific to different structures.

Interestingly, while LC3 expression has been observed in the murine brain, the GFP-LC3 mouse does not display any kind of punctate structure in the brain [25,29,31]. This differs from GABARAPL1, which does display a strong punctate labelling, and may suggest that GABARAPL1 plays a more prominent role in the autophagic process under normal conditions in the brain. This question will only be answered with the creation of a knockout mouse model for GABARAPL1. Indeed, the study of two previous knockout models against LC3B and GABARAP did not portray autophagic deregulation or pathologies linked to the disruption of the autophagosome/lysosome pathway [8,9], suggesting that a compensatory mechanism by the other members of the family is in place. Since GABARAPL1 is predominant in the mouse brain and it interacts with several adaptor proteins for selective autophagy, which degrades unwanted protein aggregates and

damaged organelles, such as p62, NBR1 (neighbor of BRCA1) and NIX (NIP3-like protein X ) [32,33,34], its extinction might present a more severe phenotype, especially in this organ.

GABARAPL1 has also been shown to bind to and is potentially implicated in trafficking of the GABA<sub>A</sub>R (gamma-aminobutyric acid type A receptor) [22]. Regulation of GABA<sub>A</sub>R numbers and clustering is important for modulation of synaptic strength at inhibitory synapses, which is mediated by an accumulation of the GABA<sub>A</sub>R at the postsynaptic dendrite to maintain neural network homeostasis [35]. Given that GABARAPL1 interacts with this receptor and is expressed in GABAergic neurons, it may also play a role for in neural network homeostasis. GABARAPL1 expression in GABAergic neurons becomes particularly interesting for studies of depression. Indeed, *gabrapl1* and *GABA<sub>A</sub>R* were found to be upregulated in the hippocampus and certain regions of the cortex of human brains affected by major depression regulated [36]. kappa opioid receptor (KOR)-induced signalling has also been implicated in depression-like behaviour [37]. Since *gabrapl1* is upregulated in major depression and GABARAPL1 interacts with and mediates KOR expression [21], then another of its functions might be to increase the transport of KOR to the plasma membrane to enhance depressive-like behaviour.

Conversely, a suppression of GABAergic inhibition has been linked to the etiology of some neurodevelopmental disorders, such as autism [38] and schizophrenia [39]. In fact, *gabrapl1* was found to be deleted in a genome wide experiment using in an European ancestry case-control data set for autism [40].

*gabrapl1* expression is also shown to be deregulated in Parkinson's disease. *gabrapl1* is downregulated in a MPTP model of Parkinson's in macaque monkeys [16] as well as in the dopaminergic neurons of the *SNpc* of Parkinson's patients [17], a region of the brain in which we have found a high expression of the GABARAPL1 protein. Moreover, GABARAPL1 can interact with  $\alpha$ -synuclein, a protein shown to form protein aggregates and deleterious lewy bodies in Parkinson's disease, and displays a higher binding affinity for  $\alpha$ -synuclein oligomers compared to monomers [41]. GABARAPL1 may, therefore, play a protective role in this disease by aiding in the degradation of unwanted  $\alpha$ -synuclein aggregates until such time as it is downregulated with the progression of the disease. Indeed, *gabrapl1* transcription is upregulated in the presence of estrogens [42] and estrogen has been show to have a protective effect on an MPTP murine model of Parkinson's disease [43].

Overall, our study describes, for the first time, the protein expression map of an autophagy factor in the adult and embryonic murine brain. Its expression and cellular localization is consistent with previous data obtained relating to its mRNA expression in the rat, suggesting a similar expression and role in different mammals. Its expression is also consistent with its involvement in receptor transport and autophagy. Moreover, its high expression in the brain and in particular in disease-linked areas such as the *substantia*

*nigra pars compacta* might set up GABARAPL1 as a potential therapeutic target for diverse neurological disorders.

## **Acknowledgements**

The GABARAP<sup>-/-</sup> 129/SvEv-C57BL/6 mouse line was kindly provided by Pr. Heinrich Betz, Department of Neurochemistry, Max-Planck-Institute for Brain Research, Frankfurt, Germany. Authors are grateful to Sophie Launay and Shawn Williams for their technical help (microscopy cores, SFR IBCT FED 4234, Besançon and UAB, Birmingham, AL) and to Gabrielle Bernard for her technical help in *in situ* hybridization and animal expertise.

## References

1. Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721.
2. Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463-477.
3. Cuervo AM (2004) Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 263: 55-72.
4. Shintani T, Klionsky DJ (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306: 990-995.
5. Ichimura Y, Imamura Y, Emoto K, Umeda M, Noda T, et al. (2004) In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J Biol Chem* 279: 40584-40592.
6. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130: 165-178.
7. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, et al. (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 29: 1792-1802.
8. Cann GM, Guignabert C, Ying L, Deshpande N, Bekker JM, et al. (2008) Developmental expression of LC3alpha and beta: absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice. *Dev Dyn* 237: 187-195.
9. O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H (2005) GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* 22: 2644-2648.
10. Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, et al. (1993) Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 90: R17-21.
11. Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z (2000) GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* 19: 1494-1504.
12. Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, et al. (2003) Expression of *gec1/GABARAPL1* versus GABARAP mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 119: 216-219.
13. Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, et al. (2006) Specific distribution of *gabarap*, *gec1/gabarap Like 1*, *gate16/gabarap Like 2*, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 1073-1074: 83-87.
14. Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, et al. (2008) Specific regional distribution of *gec1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 1210: 103-115.
15. Wang Y, Dun SL, Huang P, Chen C, Chen Y, et al. (2006) Distribution and ultrastructural localization of GEC1 in the rat CNS. *Neuroscience* 140: 1265-1276.
16. Storvik M, Arguel MJ, Schmieder S, Delerue-Audegond A, Li Q, et al. (2010) Genes regulated in MPTP-treated macaques and human Parkinson's disease suggest a common signature in prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 38: 386-394.

17. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, et al. (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain : a journal of neurology* 132: 1795-1809.
18. Le Grand JN, Chakrama FZ, Seguin-Py S, Fraichard A, Delage-Mourroux R, et al. (2011) GABARAPL1 antibodies: Target one protein, get one free! *Autophagy* 7: 1302-1307.
19. Brischoux F, Fellmann D, Risold PY (2001) Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis. *Eur J Neurosci* 13: 1733-1744.
20. Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, et al. (2010) GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 6: 495-505.
21. Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, et al. (2006) GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* 281: 7983-7993.
22. Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, et al. (2004) GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 639-648.
23. Friedman LG, Lachenmayer ML, Wang J, He L, Poulou SM, et al. (2012) Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of alpha-synuclein and LRRK2 in the brain. *J Neurosci* 32: 7585-7593.
24. Peng C, Ye J, Yan S, Kong S, Shen Y, et al. (2012) Ablation of vacuole protein sorting 18 (Vps18) gene leads to neurodegeneration and impaired neuronal migration by disrupting multiple vesicle transport pathways to lysosomes. *J Biol Chem* 287: 32861-32873.
25. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101-1111.
26. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, et al. (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* 23: 33-42.
27. Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC (2009) Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell* 33: 517-527.
28. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, et al. (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441: 885-889.
29. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, et al. (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441: 880-884.
30. Wang H, Olsen RW (2000) Binding of the GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAPGABA(A) receptor interaction. *J Neurochem* 75: 644-655.

31. Mann SS, Hammarback JA (1994) Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* 269: 11492-11497.
32. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, et al. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131-24145.
33. Larsen KB, Lamark T, Overvatn A, Harneshaug I, Johansen T, et al. (2010) A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1. *Autophagy* 6: 784-793.
34. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, et al. (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437: 1173-1178.
35. Rannals MD, Kapur J (2011) Homeostatic strengthening of inhibitory synapses is mediated by the accumulation of GABA(A) receptors. *J Neurosci* 31: 17701-17712.
36. Sequeira A, Mamdani F, Ernst C, Vawter MP, Bunney WE, et al. (2009) Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS One* 4: e6585.
37. Knoll AT, Carlezon WA (2010) Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res* 1314C: 56.
38. Hussman JP (2001) Suppressed GABAergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. *J Autism Dev Disord* 31: 247-248.
39. Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6: 312-324.
40. Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, Nations LD, Schmidt MA, et al. (2012) Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet*.
41. Schnack C, Danzer KM, Hengerer B, Gillardon F (2008) Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with Cdc42 effector proteins. *Neuroscience* 154: 1450-1457.
42. Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, et al. (2001) A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 118-125.
43. Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T (2009) Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers in neuroendocrinology* 30: 142-157.

## Figure Legends

**Figure 1. GABARAPL1 protein and *gabarapl1* mRNA staining in WT and GABARAP<sup>-/-</sup> mice.** Immunohistochemical and *in-situ* hybridization analysis of WT and GABARAP<sup>-/-</sup> cortical mouse brain tissue with an anti-GABARAPL1 antibody (**a, c-e**) and an anti-sense *gabarapl1* Dig-labelled probe (**b**). Anti-GABARAPL1 antibody displays a diffused cytoplasmic staining with brighter punctate structures (**a**: neurons of the DMX). *gabarapl1* mRNA and GABARAPL1 protein expression patterns were similar throughout the brain (**b, c**: Purkinje cells of the cerebellum). Anti-GABARAPL1 staining patterns remained the same between wild type and GABARAP knock out mice brains (**d, e**: cerebellar cortex). Scale bar represents 5  $\mu\text{m}$  (**a**), 80  $\mu\text{m}$  (**b**), 40 $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$  (**d, e**)

**Figure 2. GABARAPL1 expression in embryonic cortical primary cultures grown in NBM or DMEM medium.** Immunostaining using anti-GFAP (green), anti-GABARAPL1 (green) or anti-NeuN (red) of embryonic cortical primary neurons grown in NBM or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS. GABARAPL1 staining is abundant under conditions that support neuronal cell differentiation (NBM grown, GFAP-negative cells) and scarce under conditions that support glial cell differentiation (DMEM grown, GFAP-positive cells). All GABARAPL1 positive cells are also labeled with NeuN. Scale bar represents 40  $\mu\text{m}$  (**a, e-f**) and 80  $\mu\text{m}$  (**b-d**)

**Figure 3. GABARAPL1 expression in embryonic cortical primary cultures after Baf A1 treatment.** Immunostaining using anti-GABARAPL1 (green) and anti-p62 (red) of embryonic cortical primary neurons incubated with or without Baf A1, a described inhibitor of the autophagic flux. The control cells show a diffuse and punctiform staining of GABARAPL1 and p62 in the cell body as well as in the cell processes. The incubation of the cells with Baf A1 induces an important increase in the number of GABARAPL1 and p62-positively stained vesicles suggesting that the GABARAPL1 staining observed in neurons is due to its association with autophagic vesicles. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$



**Figure 4. Cellular localization of GABARAPL1 in various cerebral regions.**

Immunohistochemical analysis of WT mouse brain tissues with an anti-GABARAPL1 antibody (a-f). Representative images of intense labelling in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve- DMX (a) and nucleus of the diagonal band- NDB (b), moderate labelling in the paraventricular nucleus of the hypothalamus PVH (c) and the cerebellar cortex (d) and weakly labelled neurons in the caudate putamen (e) and the globus pallidus (f). Scale bar represents 20  $\mu$ m

**Figure 5. GABARAPL1 expression in the telencephalon.**

Immunohistochemical analysis of WT mouse brain tissue with an anti-GABARAPL1 antibody. Images represent typical GABARAPL1 protein expression patterns in neurons found in the cortex-CTX (b), caudate putamen-CP (c) and nucleus of the diagonal band-NDB (d). Scale bar represents 20  $\mu$ m. Abbreviations: ACB (nucleus accumbens), CLA (claustrum), CP (caudate putamen), CTX (cortex), EPd (dorsal endopiriform nucleus), IG (induseumgriseum), LPO (lateral preoptic area), LSr (lateral septal nucleus- rostral part), LSc (lateral septal nucleus-caudal part), MS (medialis strialis), NDB (nucleus of the diagonal band), OT (olfactory tract), PIR (piriform area), SI (substantia innominata)

**Figure 6. GABARAPL1 expression in different neuronal populations.**

Immunohistochemical analysis of WT mouse brain tissue with an anti-GABARAPL1 antibody and different neuronal population markers. Images represent double staining with anti-GABARAPL1 and either anti-choline acetyltransferase in the cerebellar cortex-CBX (a-c), anti-calbindin in the caudate putamen-CP (d-f), anti-parvalbumin in the globus pallidus-GP (g-i) or anti-dopamine transporter in the *substantia nigra, pars compacta*-SNpc (j-l). Scale bar represents 10 $\mu$ m

**Figure 7. GABARAPL1 expression within the diencephalon.**

Immunohistochemical analysis of WT mouse brain tissue with an anti-GABARAPL1 antibody. Images represent typical GABARAPL1 protein expression patterns in neurons found in the anterodorsal nucleus of the thalamus-AD (b) and paraventricular nucleus of the hypothalamus-PVH (c). Scale bar represents 20  $\mu$ m. Abbreviations: AD (anterodorsal nucleus of the thalamus),

AHN (anterior hypothalamic nucleus), AM (anteromedial nucleus of the thalamus), AV (anteroventral nucleus of the thalamus), BLA (basolateral nucleus of the amygdala), BMA (basomedial nucleus of the amygdala), CEA (central nucleus of the amygdala), CLA (claustrum), CM (central medial nucleus of the thalamus), COA (cortical nucleus of the amygdala), CP (caudate putamen), CTX (cortex), DG (dentate gyrus), EPd (endopiriform nucleus- dorsal part), EPv (endopiriform nucleus-ventral part), GP (globus pallidus), HPF (hippocampal formation), IA (intercalated nucleus of the amygdala), IAD (interanterodorsal nucleus of the thalamus), IAM (interanteromedial nucleus of the thalamus), IMD (intermediodorsal thalamic nucleus), LD (lateral dorsal nucleus of the thalamus), LH (lateral habenula), LHA (lateral hypothalamus area), MD (mediodorsal nucleus of the thalamus), MEA (medial nucleus of the amygdala), MH (medial habenula), NLOT (nucleus of the lateral olfactory tract), PIR (piriform area), PVH (paraventricular nucleus of the hypothalamus), PVT (paraventricular nucleus of the thalamus), RE (nucleus reuniens), RH (rhomboid nucleus), RT (reticular nucleus of the thalamus), SI (substantia innominata), SMT (submedial nucleus of the thalamus), VAL (ventral anterior-lateral complex of the thalamus), VM (ventral medial nucleus of the thalamus), ZI (zona incerta)

**Figure 8. GABARAPL1 expression within the mesencephalon.** Immunohistochemical analysis of WT mouse brain tissue with an anti-GABARAPL1 antibody. Displayed are representative images of the ventral tegmental area (VTA) (**b**), *the substantia nigra pars compacta* (SNpc) (**c**), and hippocampal formation (HPF) (**d**). Scale bar represents 20µm. Abbreviations: CTX (Cortex), CA1/3 (ammon's horn, field CA1/CA3), ENT/ENTl (entorhinal area, lateral part), DG (dentate gyrus), HPF (hippocampal formation), IF (interfascicular nucleus raphé), INC (interstitial nucleus of Cajal), IPN (interpenduncular nucleus), MG (medial geniculate complex), MRN (mesencephalic reticular nucleus), ND (nucleus of Darkschewitsch), PAG (periaque ductal gray), PG (pontine gray), RL (rostral linear nucleus raphé), RN (red nucleus), SC (superior colliculus), SNC/r (*substantia nigra*, compact part/reticular part), SUBd/v (subiculum, dorsal part/ventral part), TR (post-piriform transition area), VTA (ventral tegmental area)

**Figure 9. GABARAPL1 expression within the rhombencephalon.**

Immunohistochemical analysis of WT mouse brain tissue with an anti-GABARAPL1 antibody. Displayed are representative images of the Purkinje cells of the cerebellum (**b**), dorsal motornucleus of the vagus nerve-DMX (**c**) and hypoglossal nucleus-XII (**d**). Scale bar represents 20 $\mu$ m. Abbreviations: AMB (nucleus ambiguus), AN (ansiform lobule), AP (area postrema), CBX (cerebellar cortex), COPY (copula pyramidis), CU (cuneate nucleus), DEC (declive), DMX (dorsal motornucleus of the vagus nerve), ECU (external cuneate nucleus), IO (inferior olivary complex), IRN (intermediate reticular nucleus), LRN (lateral reticular nucleus), MDRN (medullary reticular nucleus), NTS (nucleus of the solitary tract), PARN (parvicellular reticular nucleus), PAS (parasolitary nucleus), PRM (paramedian lobule), PYR (pyramus), SPV (spinal nucleus of the trigeminal), RO (nucleus raphé obscurus), RPA (nucleus raphé pallidus), UVU (uvuia), XII (hypoglossal nucleus)

**Figure 10. GABARAPL1 expression during embryonic development (E11 to E17).**

Western blotting analysis of WT mouse head tissue protein extracts using anti-GABARAPL1 and anti-Actin antibodies (**a**). Quantification of GABARAPL1 protein expression levels in the developing embryonic mouse brain (**b**). GABARAPL1 signals were normalized according to Actin amounts for each sample then displayed as a percentage of control adult brain expression. Data = mean  $\pm$  SEM. \*\* $p$ <0.05 versus E11, \* $p$ <0.1 versus E11

**Figure 11. GABARAPL1 expression in the diencephalon and rhombencephalon of an E11 embryo.**

Videomicrographs of GABARAPL1-immunolabeled horizontal sections passing through the diencephalon (**a, b**) or rhombencephalon (**c, d**) of an E11 embryo. The GABARAPL1 immunohistochemical signal is intense in the mantle layer but is not observed in the germinal neuroepithelial layer. In the mantle layer, both immature neurons and fiber tracts are labeled. This is obvious in the mesencephalon, in which the large decussation of the pyramidal commissure is intensely labeled (**c**). At higher magnifications (**b, d**) the signal is detected within the cytoplasm of immature neurons (whole mantle layer in **b**, arrow in **d**), in which it is diffusely distributed, or large fibers (arrowheads in **d**). Scale bar represents 200  $\mu$ m (**a, c**), 50  $\mu$ m (**b, d**). Abbreviations: AQ (aqueduct), IC (inferior colliculus), mtl (mantle layer), nh (neuroepithelial layer), pyd (pyramidal tract),

3v (third ventricle), 4v (fourth ventricle)

**Figure 12. GABARAPL1 expression in the telencephalon, tectum, pallium and rhombencephalon of an E14 embryo.** Videomicrographs of GABARAPL1-immunolabeled horizontal sections passing through the telencephalon and tectum (**a, b**), pallium (**c**) or rhombencephalon (**d**) of an E14 embryo. GABARAPL1 labeling in the mantle layer is intense in all regions, with both cell bodies and fiber tracts (posterior commissure in **a** or Hook bundle in **d**) displaying the immunohistochemical signal. In the pallium, ventricular and subventricular zones as well as the subplates are not intensely labeled, while the intermediate zone and cortical plates display an intense labeling. Note the absence of staining in the choroid plexus. Scale bar represents 200  $\mu\text{m}$  (**a, c**) and 50  $\mu\text{m}$  (**b, d**). Abbreviations: AQ (aqueduct), ch (choroid plexus), cp (cortical plate), hb (Hook bundle), hbr (habenular recess), IC (inferior colliculus), iz (intermediate zone), lv (lateral ventricle), pc (posterior commissure), sbp (subplate), svz (subventricular zone), vz (ventricular zone), 4v (fourth ventricle)

**Figure 13. GABARAPL1 expression in the telencephalon and rhombencephalon of an E17 embryo.** Videomicrographs of GABARAPL1-immunolabeled horizontal sections passing through the telencephalon (**a, b**), eye (**c**) or rhombencephalon (**d-f**) of an E17 embryo. GABARAPL1 labeling is present in both perikarya and fiber tracts (note the dense labeling of the optic tract as it leaves the eye. In the pallium, the intermediate zone is particularly well labeled. However, in the rhombencephalon, the labeling is less homogeneous than in earlier stages, and some cell bodies display a labeling which is more intense than in surrounding tissue, indicating that the adult pattern is beginning to differentiate. This is clear in the motoneurons of the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve (**e**, arrows in **f**). A punctate-like staining also became visible at this stage (arrows in **d**). Scale bar represents 300  $\mu\text{m}$  (**a**), 100  $\mu\text{m}$  (**b, c, e**), 20  $\mu\text{m}$  (**f**) and 10  $\mu\text{m}$  (**d**). Abbreviations: iz (intermediate zone), opt (optic tract)

**TABLE 1. Distribution of GABARAPL1 in the Mouse Brain**

Region	Expression	Region	Expression
<b>CEREBRUM</b>			
<b>CEREBRAL CORTEX</b>			
isocortex, layer 1-6 (ISO1-6)	+/++++	magnocellular preoptic nucleus (MA)	+++
main olfactory bulb (MOB)	+/++	medial septal nucleus (MS)	+++
accessory olfactory bulb (AOB)	+/++	nucleus of the diagonal band (NDB)	+++
anterior olfactory nucleus (AON)	+/++	triangular nucleus of the septum (TRS)	+
taenia tecta (TT)	++	bed nucleus of the stria terminalis (BST)	+/++
piriform area (PIR)	0/++	bed nucleus of the anterior commissure (BAC)	0/+
nucleus of the lateral olfactory tract, pyramidal layer (NLOT2)	++	bed nucleus of the stria medullaris (BSM)	0/+
cortical nucleus of the amygdala (COA)	++	<b>CEREBELLUM</b>	
agranular insular area (AI)	+/++++	<b>CEREBELLAR CORTEX (CBX)</b>	
anterior cingulate area (ACA)	+/++++	Vermal regions (VERM)	+/++
ectothalamic area (ECT)	+/++++	Hemispheric regions (HEM)	+/++
Retrohippocampal region (RHP)		<b>DEEP CEREBELLAR NUCLEI (DNC)</b>	
entorhinal area (ENT)	+/++++	Fastigial nucleus (FN)	+++
presubiculum (PRE)	+/++++	Interposed nucleus (IP)	+/++++
postsubiculum (POST)	+/++++	Dentate nucleus (DN)	++
parasubiculum (PAR)	+/++++	<b>BRAINSTEM</b>	
Subiculum, pyramidal layer (SUB-sp)	+/++++	<b>THALAMUS (TH)</b>	
Hippocampal region (HIP)		anteroventral nucleus of the thalamus (AV)	++
Ammon's horn: field CA1-3 (CA1-3)		anteromedial nucleus of the thalamus (AM)	+
stratum lacunosum-moleculare (-slm)	0	anterodorsal nucleus of the thalamus (AD)	+++
stratum radiatum [Meynert] (-sr)	0	mediodorsal nucleus of the thalamus (MD)	+
pyramidal layers (-sp)	+/++++	paraventricular nucleus of the thalamus (PVT)	++
stratum oriens (-so)	0	nucleus reuniens (RE)	+
stratum lucidum (CA3slu)	0	central medial nucleus of the thalamus (CM)	+
Dentate gyrus: crest (DGcr), lateral blade (DGLb), medial blade (DGmb)		paracentral nucleus of the thalamus (PCN)	+
molecular layers (-mo)	0	parafascicular nucleus (PF)	+
granule cell layers (-sg)	+/++++	supragenulate nucleus (SGN)	+
polymorph layers (-po)	+	ventral anterior-lateral complex of the thalamus (VAL)	+
induseum griseum (IG)	++	ventral posterolateral nucleus of the thalamus (VPL)	+
fasciola cinerea (FC)	+	ventral posteromedial nucleus of the thalamus (VPM)	+
Infralimbic area (ILA)	+/++++	Medial geniculate complex (MG)	+/++
Orbital area (ORB)	+/++++	Medial habenula (MH)	+/++
Perihinal area (PERI)	+/++++	Lateral habenula (LH)	++
Prelimbic area (PL)	+/++++	Reticular nucleus of the thalamus (RT)	++
Retrosplenial area (RSP)	+/++++	Zona incerta (ZI)	+
Ventral temporal association areas (TEv)	+/++++	<b>HYPOTHALAMUS</b>	
Layer 6b, isocortex (6b)	+++	<b>Periventricular zone of the hypothalamus (PVZ)</b>	
Clastrum (CLA)	+++	vascular organ of the lamina terminalis (OV)	+
Endopiriform nucleus (EP)	+/++++	suprachiasmatic preoptic nucleus (PSCH)	+/++
Basolateral nucleus of the amygdala (BLA)	+	median preoptic nucleus (MEPO)	+/++
Basomedial nucleus of the amygdala (BMA)	0/+	anteroventral periventricular nucleus (AVPV)	+/++++
Posterior nucleus of the amygdala (PA)	0/+	preoptic periventricular nucleus (PVpo)	+
<b>BASAL NUCLEI</b>		supraoptic nucleus (SO)	++
caudoputamen (CP)	+	paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH)	+/++++
nucleus accumbens (ACB)	+	anterior periventricular nucleus of the hypothalamus (PVa)	+
fundus of the striatum (FS)	0/+	dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH)	+/++
olfactory tubercle (OT)	+/++++	intermediate periventricular nucleus of the hypothalamus (PVi)	+
islands of Calleja (isl)	0/+		
major island of Calleja (islm)	0/+		
lateral septal nucleus (LS)	++		
septofimbrial nucleus (SF)	+		
septohippocampal nucleus (SH)	0/+		
anterior amygdaloid area (AAA)	+		
central nucleus of the amygdala (CEA)	+		
medial nucleus of the amygdala (MEA)	++		
bed nucleus of the accessory olfactory tract (BA)	+		
intercalated nucleus of the amygdala (IA)	+		
globus pallidus (GP)	0/+		
substantia innominata (SI)	+/++		

Region	Expression
arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH)	+++
posterior periventricular nucleus of the hypothalamus (PVp)	+
<b>Medial zone of the hypothalamus (MEZ)</b>	
medial preoptic area (MPO)	+ / ++
medial preoptic nucleus (MPN)	++ / +++
anterodorsal preoptic nucleus (ADP)	+ / ++
anteroventral preoptic nucleus (AVP)	++
suprachiasmatic nucleus (SCH)	+
subparaventricular zone (SBPV)	+
ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH)	++
premamillary nucleus (PM)	++
tuberomammillary nucleus (TM)	+++
supramammillary nucleus (SUM)	+ / ++
medial mammillary nucleus (MM)	++ / +++
lateral mammillary nucleus (LM)	+++
posterior hypothalamus nucleus (PH)	+
<b>Lateral zone of the hypothalamus (LZ)</b>	
lateral preoptic area (LPO)	+ / ++
lateral hypothalamus area (LHA)	++ / +++
tuberal nucleus (TU)	+
subthalamic nucleus (STN)	++
<b>MIDBRAIN-HINDBRAIN</b>	
<b>SENSORY</b>	
superior colliculus (SC)	0 / ++
parabigeminal nucleus (PBG)	+ / ++
olivary pretectal nucleus (OP)	+
nucleus of the optic tract (NOT)	+
posterior pretectal nucleus (PPT)	+
nucleus of the posterior commissure (NPC)	0 / +
anterior pretectal nucleus (APN)	+
medial pretectal area (MPT)	+
medial terminal nucleus of the accessory optic tract (MT)	+
lateral terminal nucleus of the accessory optic tract (LT)	+
dorsal terminal nucleus of the accessory optic tract (DT)	+
trigeminal ganglion (GV)	++ / +++
mesencephalic nucleus of the trigeminal (MEV)	++ / +++
principle sensory nucleus of the trigeminal (PSV)	+
spinal nucleus of the trigeminal (SPV)	+
paratrigeminal nucleus (PAT)	+ / ++
dorsal column nuclei (DCN)	+
external cuneate nucleus (ECU)	+++
cochlear nuclei (CN)	+
dorsal nucleus (DCO)	+
ventral nucleus (VCO)	+++
nucleus of the trapezoid body (NTB)	+++
superior olivary complex (SOC)	+++
nucleus of the lateral lemniscus (NLL)	++
interior colluclus (IC)	+
nucleus of the brachium of the inferior colliculus (NB)	0 / +
nucleus sagulum (SAG)	+ / ++
medial vestibular nucleus (MV)	+
lateral vestibular nucleus (LAV)	++
superior vestibular nucleus (SUV)	0 / +
spinal vestibular nucleus (SPIV)	++
nucleus intercalatus (NIS)	++ / +++
nucleus prepositus (PRP)	0 / +

Region	Expression
nucleus of Roller (NR)	+ / ++
nucleus x (x)	++
nucleus (y)	++
infracerebellar nucleus (ICB)	++
nucleus of the solitary tract (NTS)	+
area postrema (AP)	0 / +
parabrachial nucleus (PB)	++
Kölliker-Fuse subnucleus (KF)	++
<b>MOTOR</b>	
oculomotor nucleus (III)	++
trochlear nucleus (IV)	++
abducens nucleus (VI)	++
accessory abducens nucleus (ACVI)	++
motor nucleus of the trigeminal (V)	++
parvicellular part (Vpc)	++
facial nucleus (VII)	++
accessory facial nucleus (ACVII)	++
efferent vestibular nucleus (EV)	++ / +++
nucleus ambiguous, dorsal division (AMBd)	++
hypoglossal nucleus (XII)	+++
Edinger-Westphal nucleus (EW)	0 / +
superior salivatory nucleus (SSN)	+
inferior salivatory nucleus (ISN)	+
dorsal motornucleus of the vagus nerve (DMX)	+++
nucleus ambiguous, ventral division (AMBv)	++
compact part (SNc)	+++
reticular part (SNr)	+
ventral tegmental area (VTA)	+++
<b>PRE- &amp; POSTCEREBELLAR NUCLEI</b>	
Pontine gray (PG)	++ / +++
tegmental reticular nucleus (TRN)	+
Inferior olivary complex (IO)	++ / +++
Lateral reticular nucleus (LRN)	++ / +++
Linear nucleus of the medulla (LIN)	++
Paramedian reticular nucleus (PMR)	++
Parasolitary nucleus (PAS)	+
Red nucleus (RN)	++ / +++
<b>RETICULAR CORE</b>	
periaqueductal gray (PAG)	0 / +
interstitial nucleus of Cajal (INC)	+
nucleus of Darkschewitsch (ND)	+
dorsal tegmental nucleus (DTN)	++
ventral tegmental nucleus (VTN)	++
anterior tegmental nucleus (AT)	+ / ++
lateral tegmental nucleus (LTN)	++
laterodorsal tegmental nucleus (LDT)	++
sublaterodorsal nucleus (SLD)	++
locus coeruleus (LC)	++
subcoeruleus nucleus (SLC)	++
Barrington's nucleus (B)	++
supragenual nucleus (SG)	++ / +++
pontine central gray (PCG)	++
Raphé nuclei (RA)	+ / ++
nucleus incertus (NI)	++
Reticular formation (RET)	+ / ++

**Table 1.** Distribution of GABARAPL1 in the Mouse Brain. GABARAPL1 protein expression in different regions of the mouse CNS is displayed with a relative quantification of the intensity of staining observed. 0: absence of labeling, +: weak intensity, ++ moderate intensity, +++: strong intensity

Figure 1 :

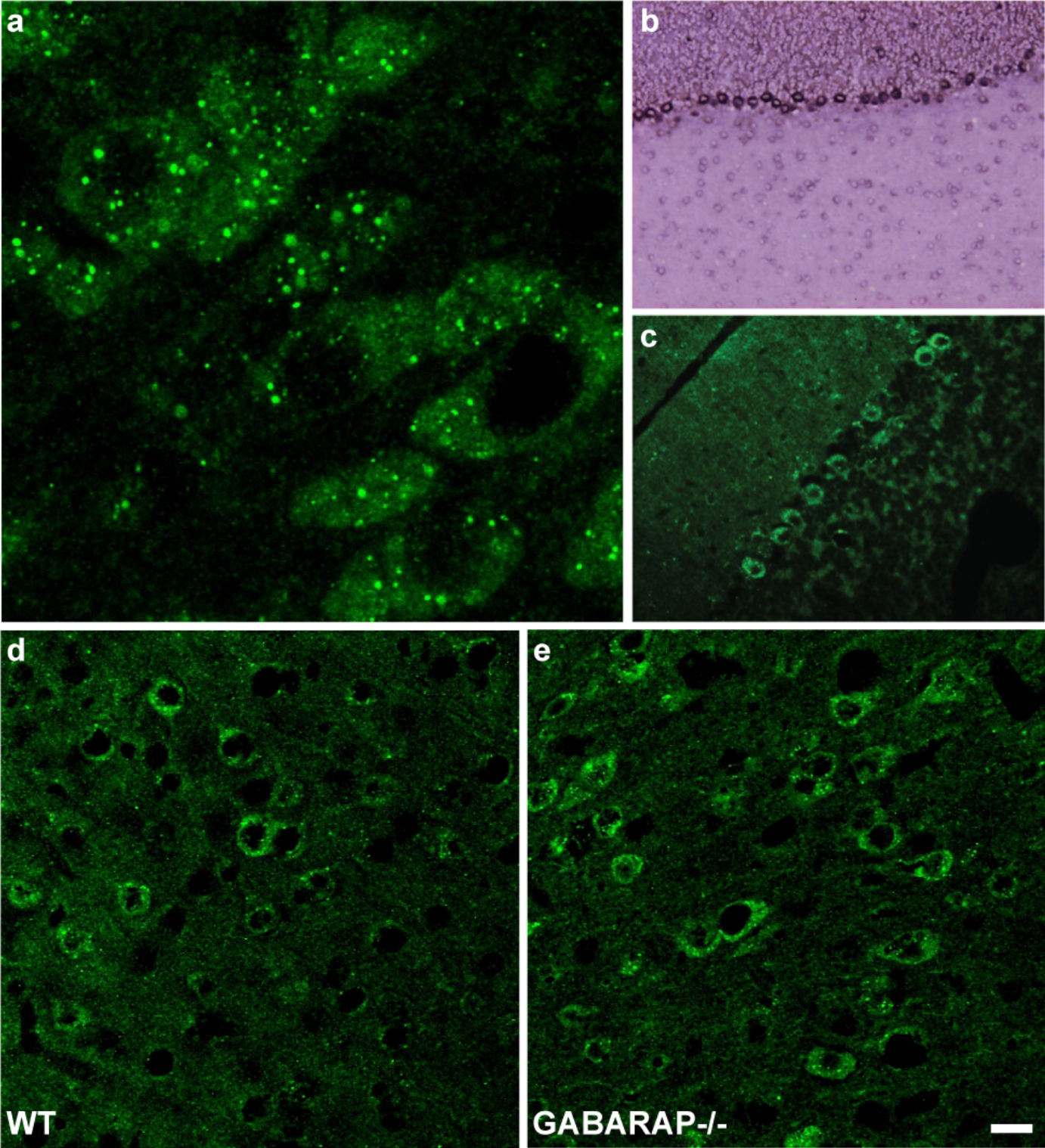




Figure 2 :

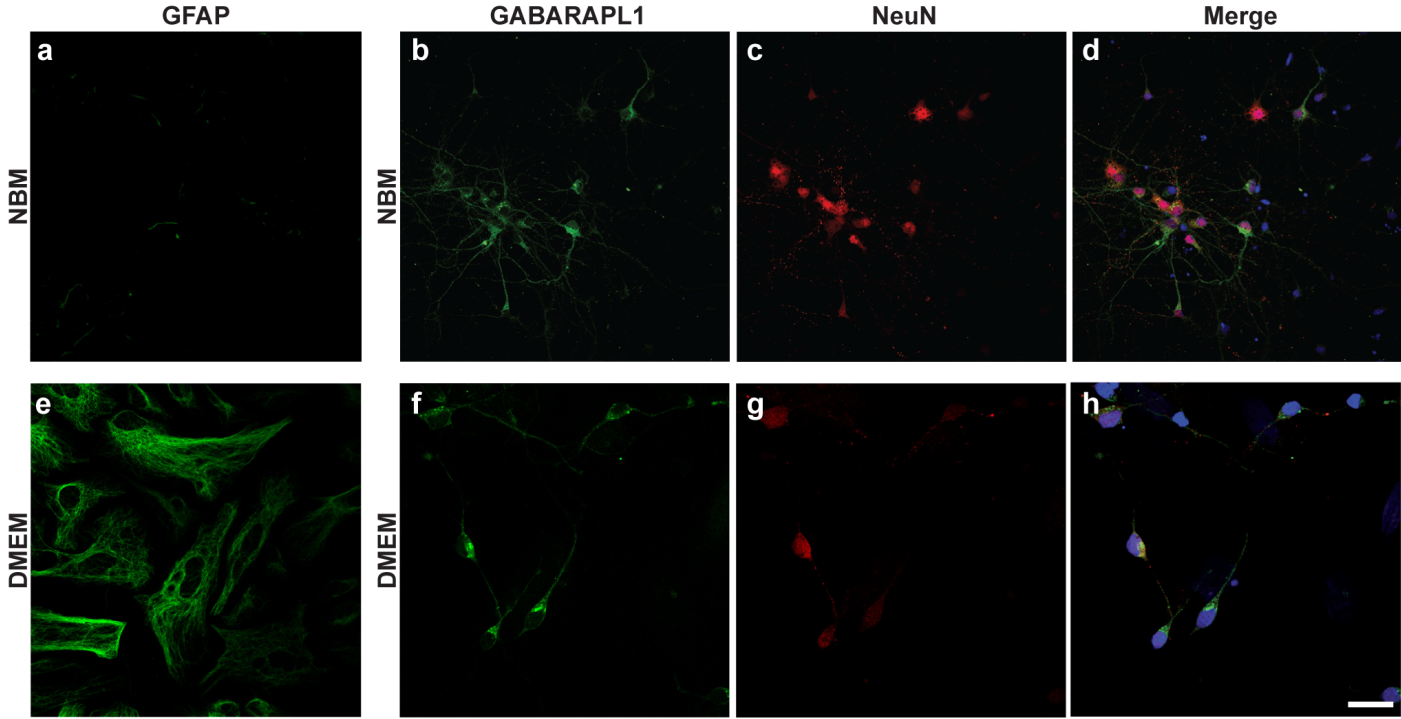
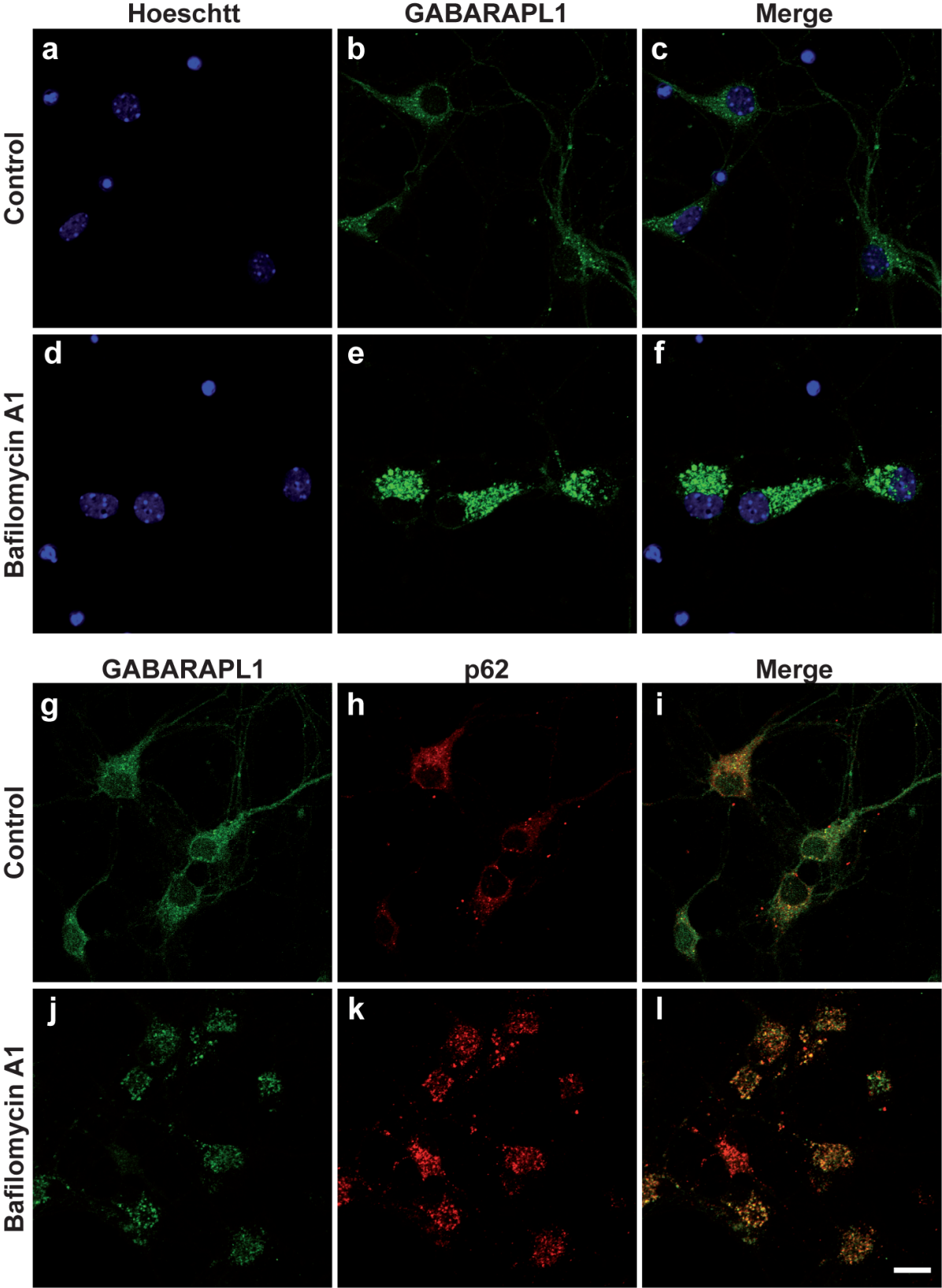




Figure 3 :



**Figure 4 :**

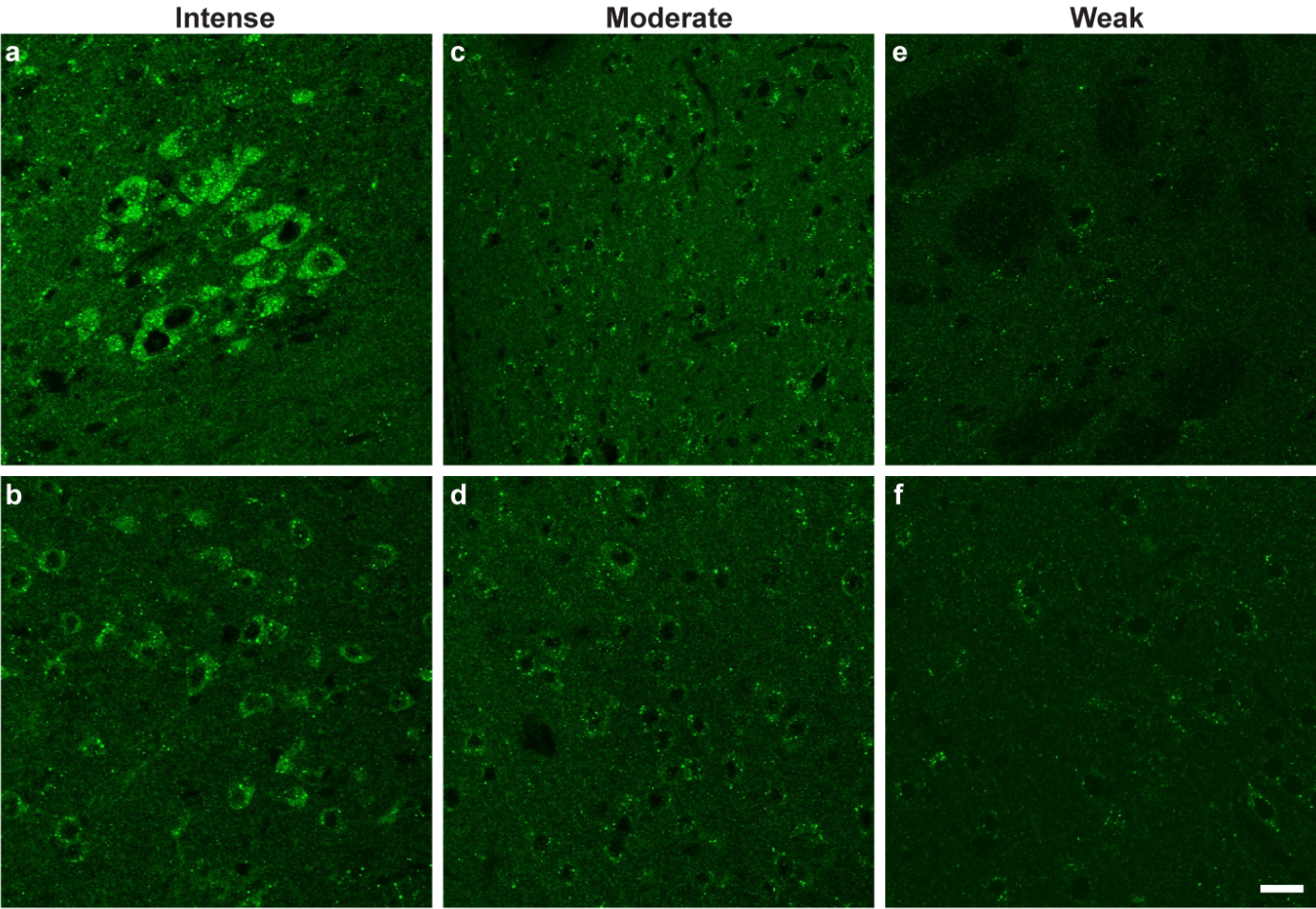


Figure 5 :

a

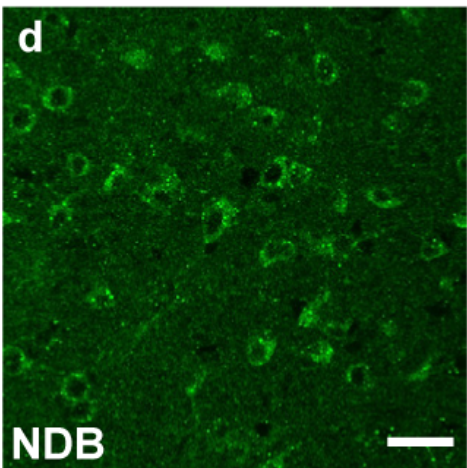
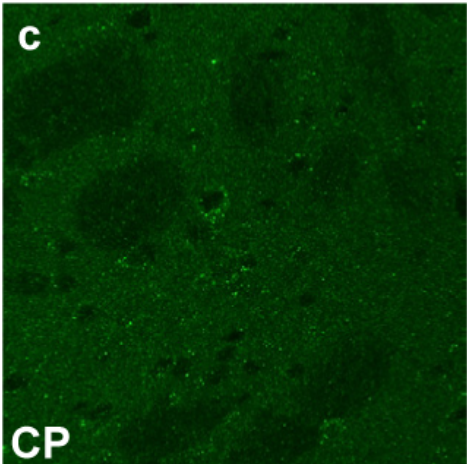
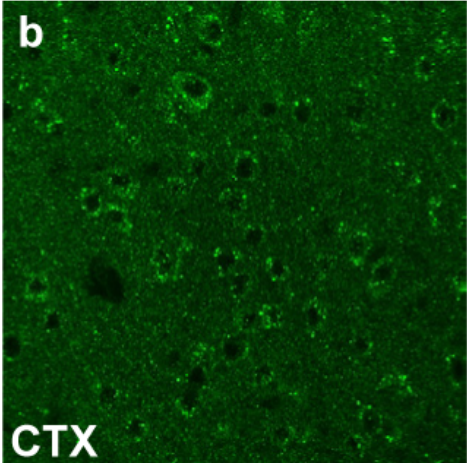
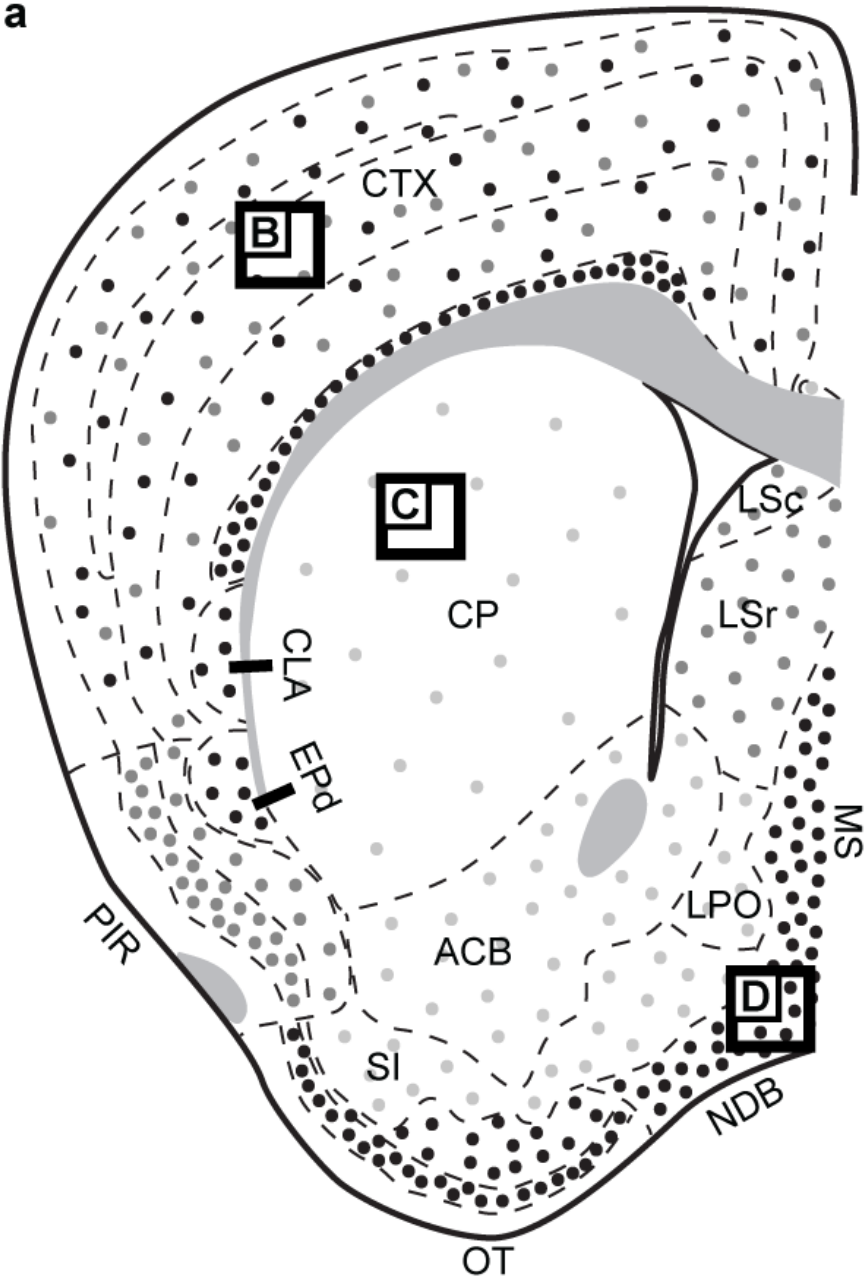




Figure 6 :

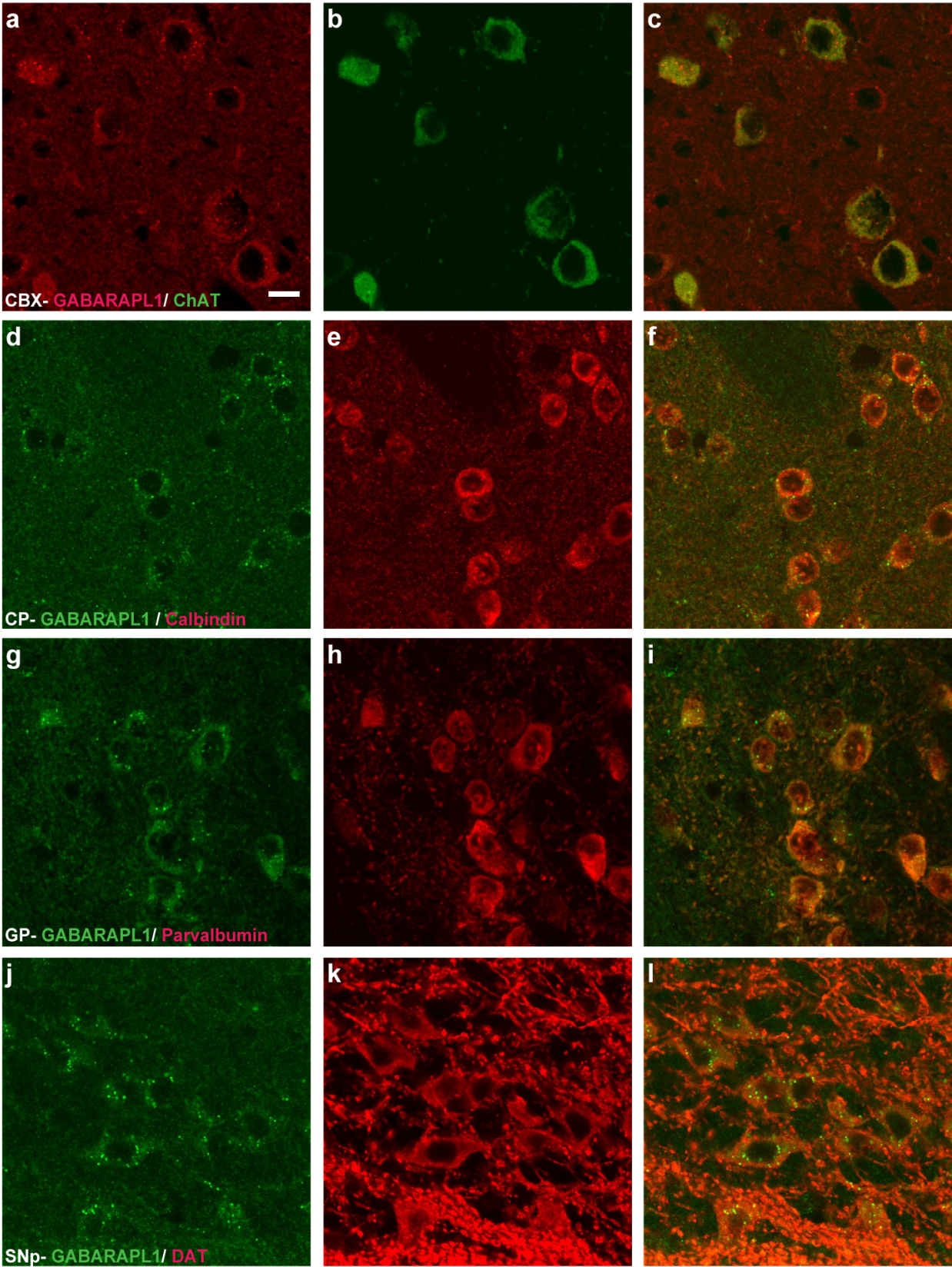






Figure 8 :

a

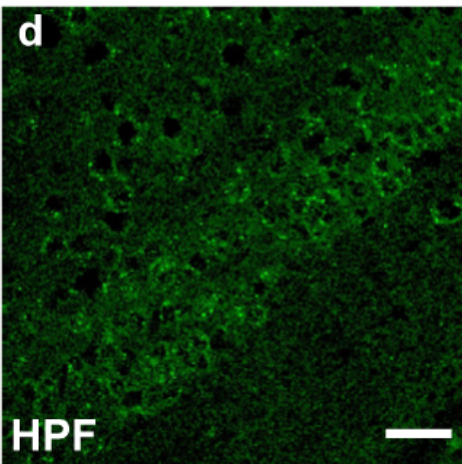
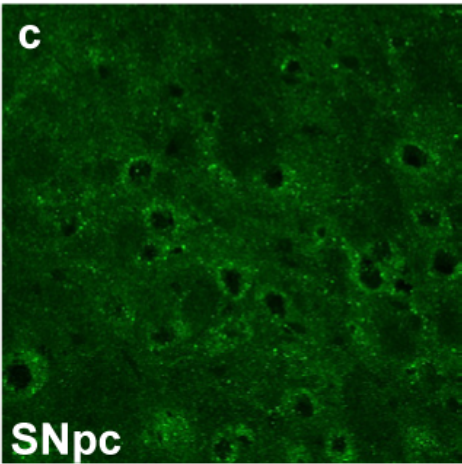
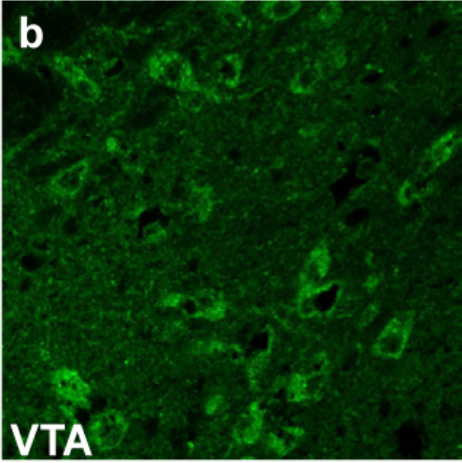
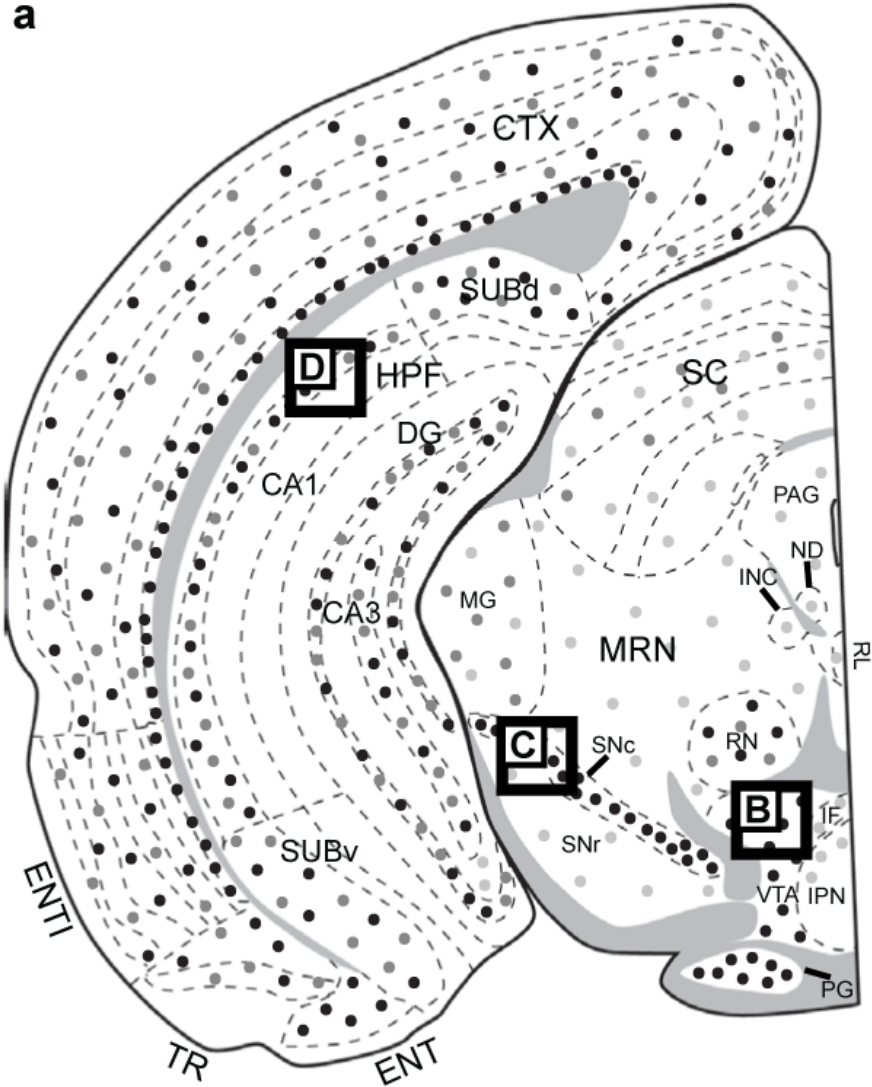


Figure 9 :

a

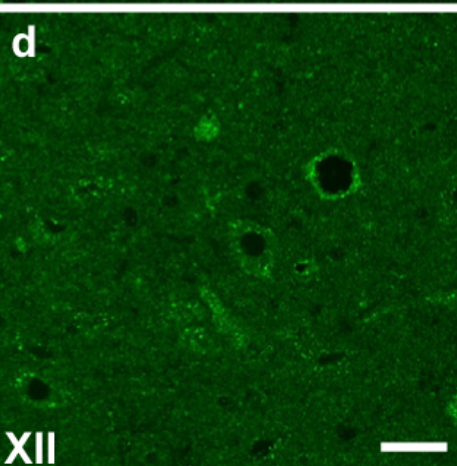
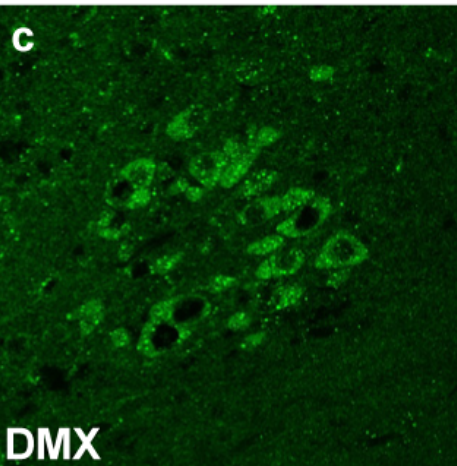
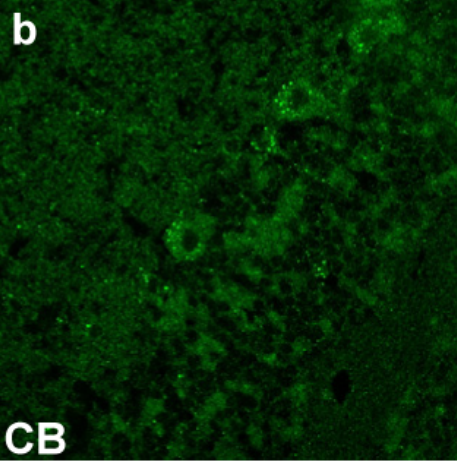
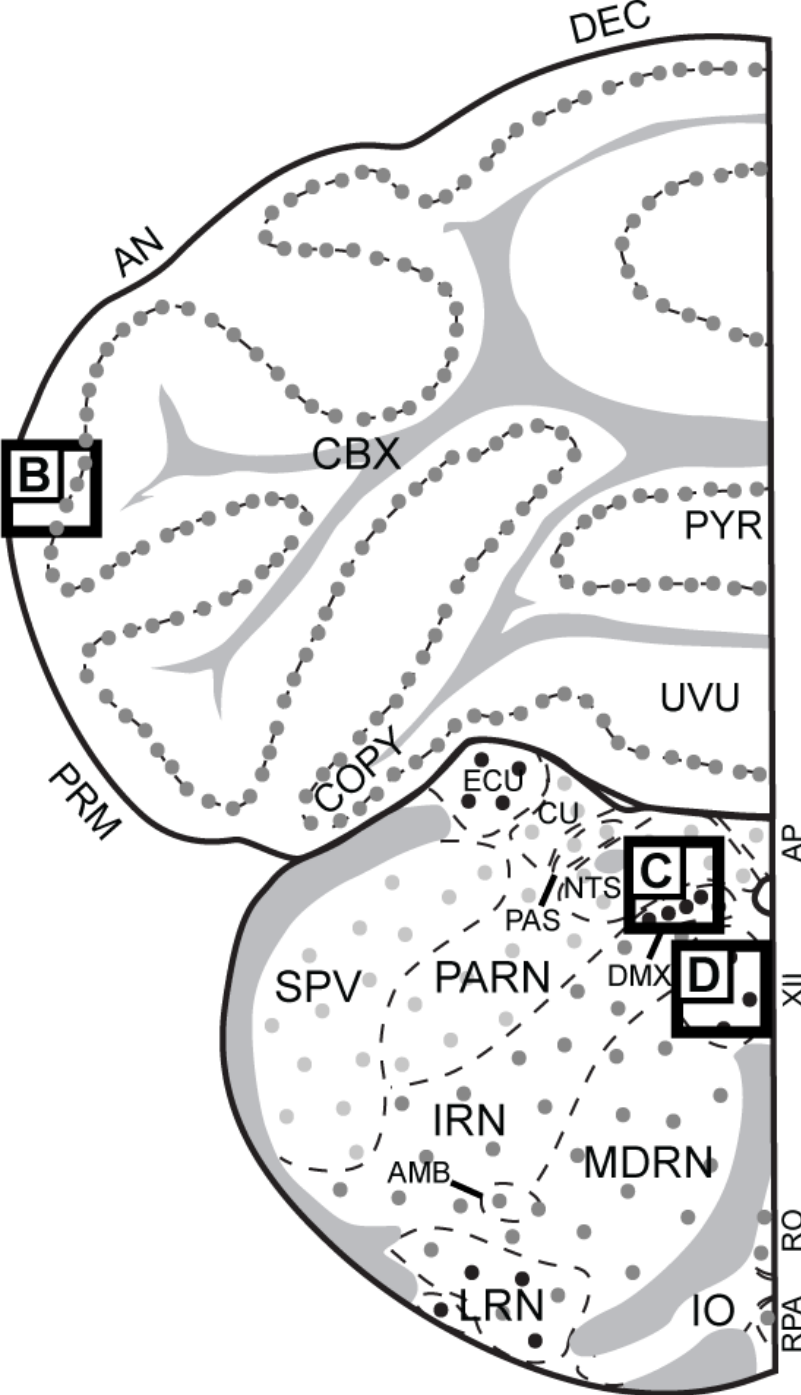


Figure 10 :

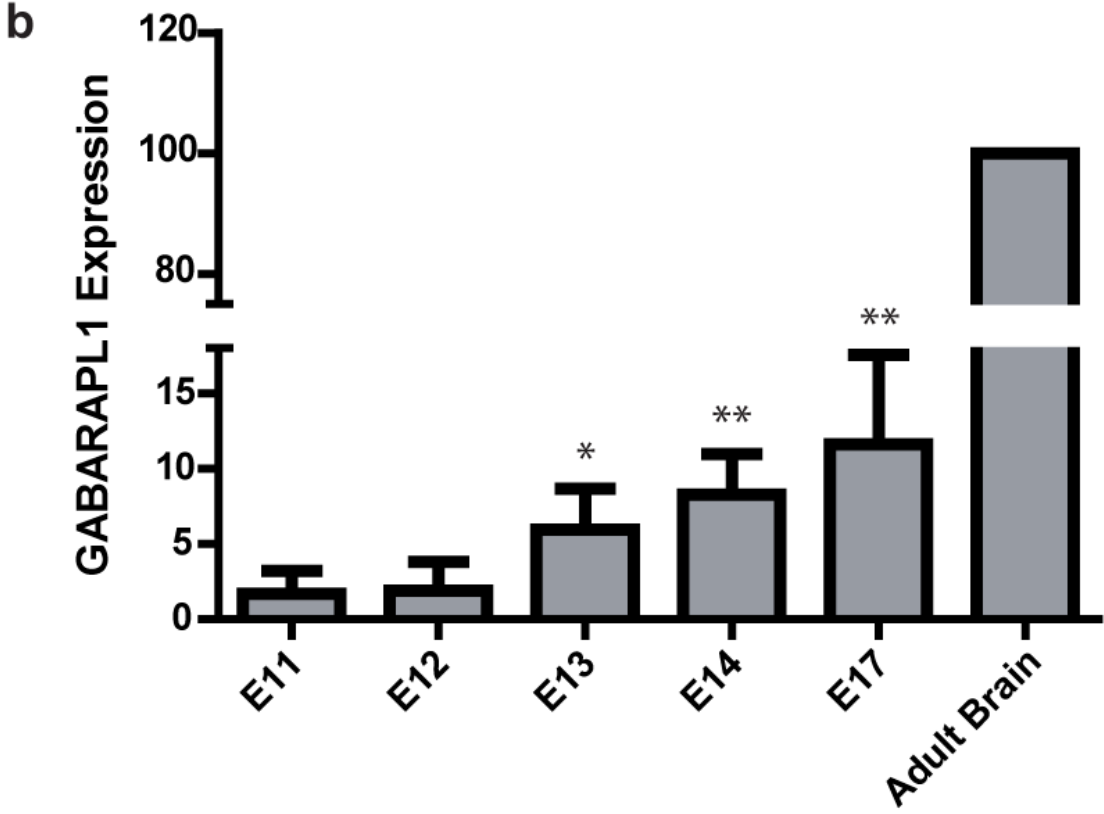
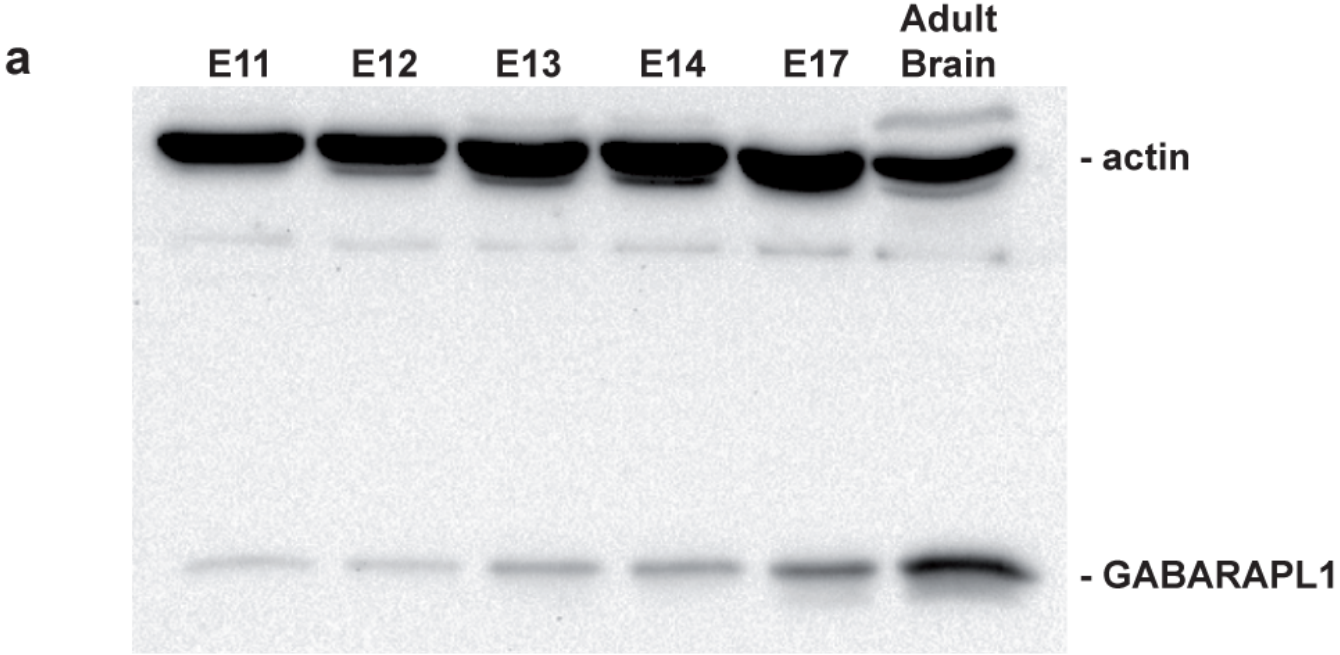




Figure 11 :

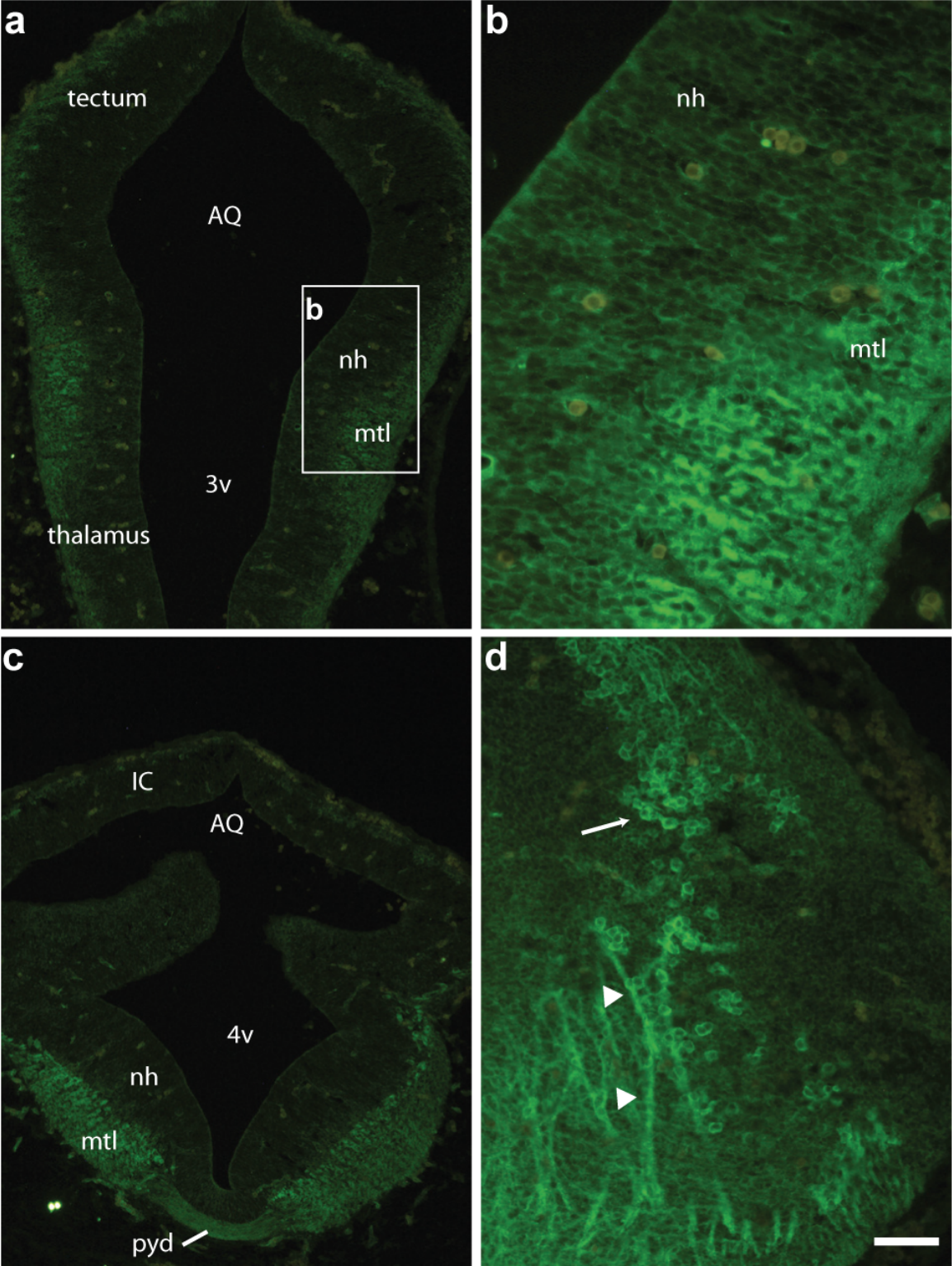




Figure 12 :

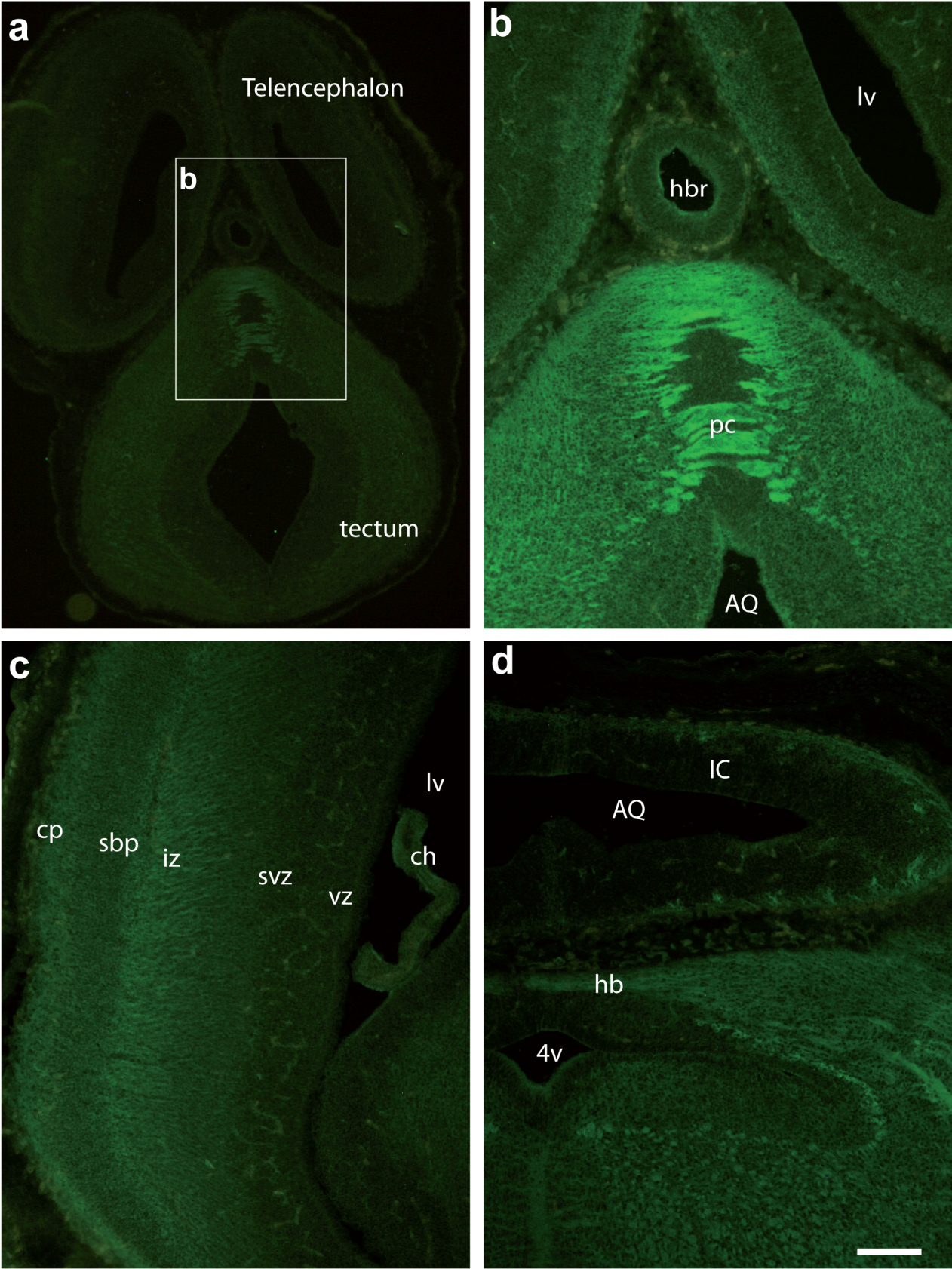
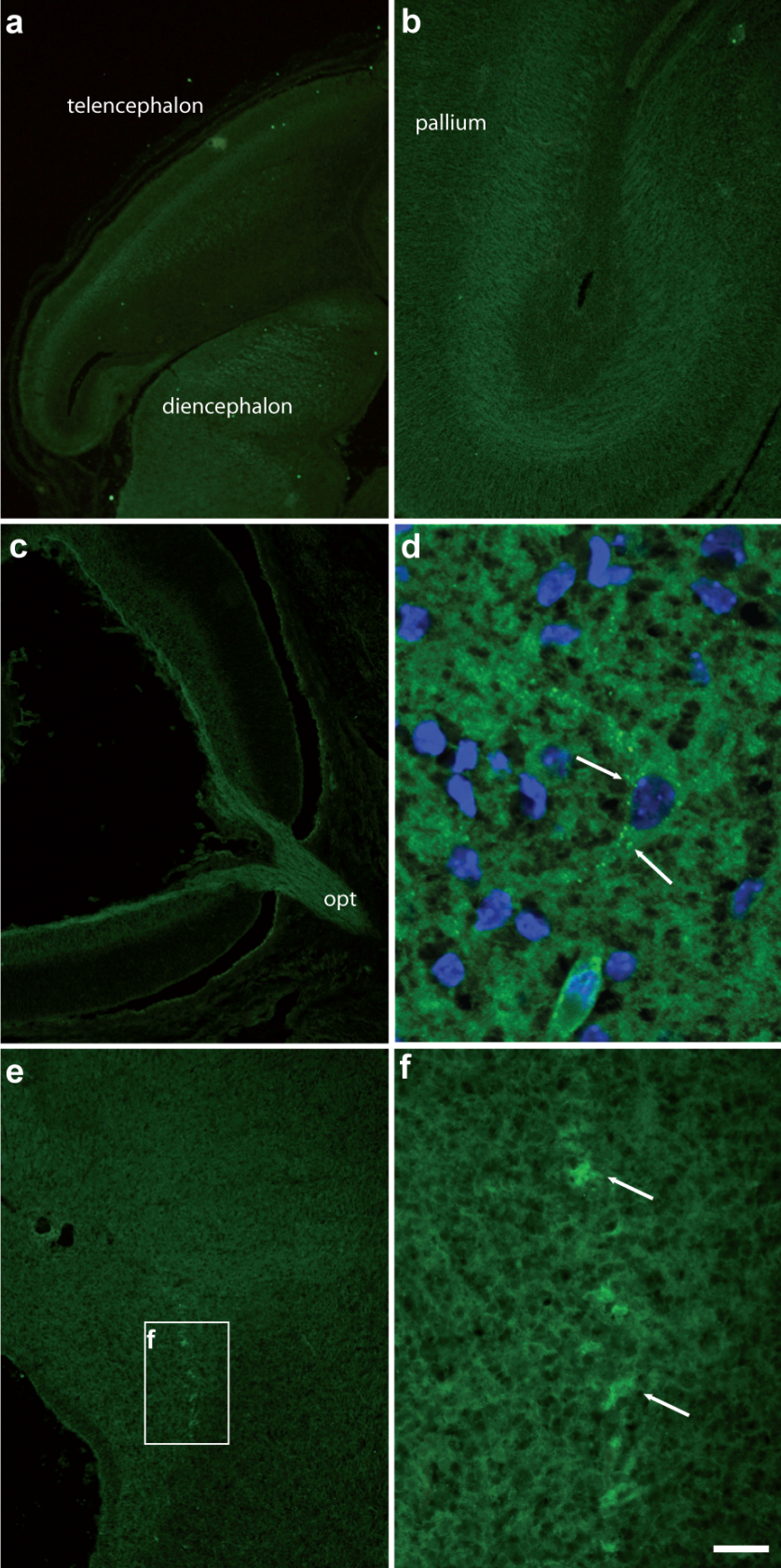




Figure 13 :



### III ETUDE DU ROLE DE GABARAPL1 EN CONDITIONS DE STRESS DANS UN MODELE IN VITRO DE LIGNEE CELLULAIRE NEURONALE STABLE

Comme mentionné précédemment, l'autophagie basale joue un rôle important dans l'homéostasie des neurones notamment lors de la dégradation des protéines et des organites endommagés. De plus, une activité réduite de l'autophagie dans les neurones a été associée à la progression des maladies neurodégénératives (Cataldo et al., 1996; Anglade et al., 1997; Kegel et al., 2000).

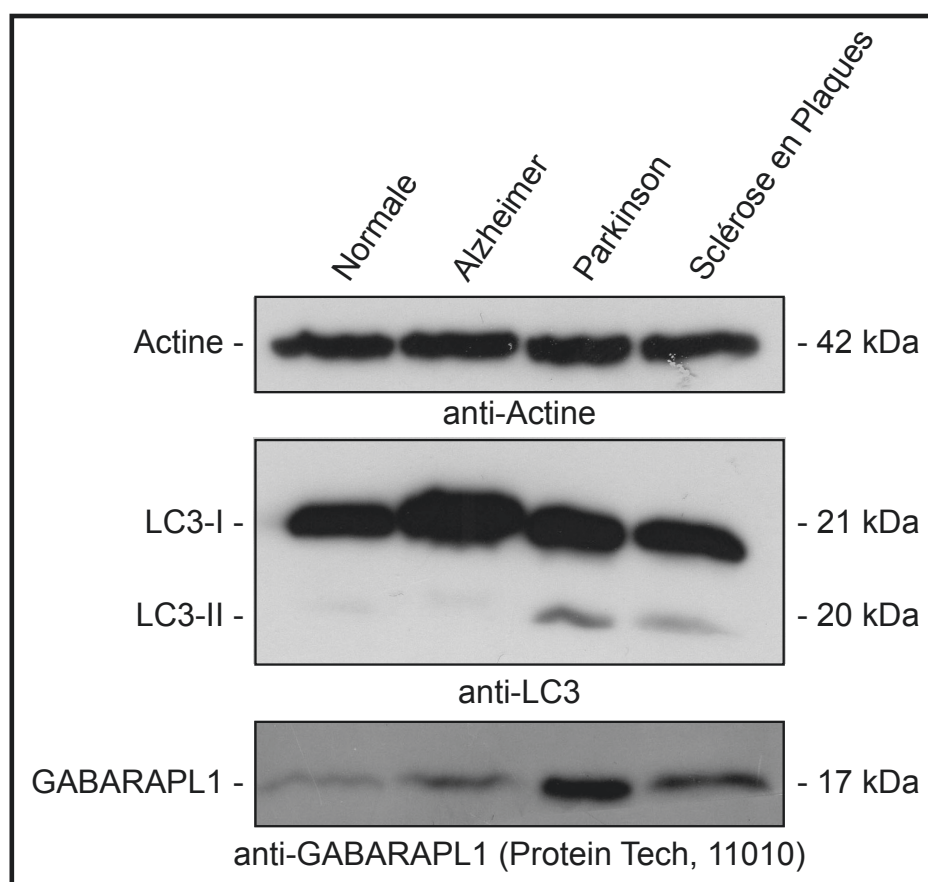
Au début de ma thèse, j'ai participé à une étude ayant pour but de caractériser le rôle de GABARAPL1 dans le processus de l'autophagie. Dans cette étude, nous avons démontré que GABARAPL1 :

- est clivée au niveau de sa glycine C-terminale pour donner la forme mature de la protéine (GABARAPL1-I) ;
- est conjuguée aux phospholipides pour donner la forme conjuguée de la protéine (GABARAPL 1-II) ;
- est concentrée dans les fractions membranaires des cellules contenant notamment les vésicules autophagiques ;
- co-localise partiellement avec LC3 et les lysosomes.

Les résultats de cette étude (publiée dans le journal *Autophagy* en 2010, publication IV en annexe) ont démontré pour la première fois que la protéine GABARAPL1 est associée à des vésicules autophagiques.

En outre, la protéine GABARAPL1 participe à la dégradation spécifique de protéines et organites endommagés en faisant le lien entre les adaptateurs de l'autophagie spécifique et la membrane de l'autophagosome. En effet, il a été décrit dans la littérature que GABARAPL1 interagit avec l'adaptateur mitochondrial, NIX, lors de la mitophagie, ou avec l'adaptateur p62, lors de la dégradation des substrats ubiquitinylés. Il est intéressant de constater que GABARAPL1 peut aussi interagir avec les oligomères de l' $\alpha$ -synucléine, une protéine impliquée dans la progression de la maladie de Parkinson.

Son rôle dans l'autophagie, son expression neuronale et le fait que GABARAPL1 soit fortement exprimée dans les neurones avec des fonctions somato-motrices tels que les neurones dopaminergiques de la partie compacte de la substance noire nous ont permis de proposer l'hypothèse selon laquelle cette protéine pourrait jouer un rôle essentiel lors de la progression des maladies neurodégénératives. D'autre part, des études récentes ont démontré une dérégulation de l'expression du gène *gabarapl1* dans différents modèles de neurodégénérescence. Par exemple, l'expression de *gabarapl1* est diminuée dans le cortex préfrontal de macaques traités par le MPTP, un traitement chimique qui induit la dégénérescence des neurones dopaminergiques, ainsi que dans les neurones dopaminergiques de la partie compacte de la substance noire de patients atteints de la maladie de Parkinson (Simunovic *et al.*, 2009; Storvik *et al.*, 2010). De plus, il a été observé au laboratoire une augmentation de l'expression de la protéine GABARAPL1 dans des extraits totaux de cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson (**Figure 13**).



**Figure 13 : Expression de la protéine GABARAPL1 dans les maladies neurodégénératives.**

Des lysats de cerveaux de patients affectés par les maladies indiquées ont été obtenus auprès de la société BioChain (San Francisco, USA). Les protéines totales (50 µg) ont été séparées sur des gels SDS-PAGE 15 % et transférées sur des membranes PVDF. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires suivants : polyclonal anti-Actine (Sigma, 1/3000<sup>e</sup>), polyclonal anti-LC3 (Novus Biologicals, 1/1000<sup>e</sup>) ou polyclonal anti-

GABARAPL1 (Protein Tech Group, 1/1000<sup>e</sup>) et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin HRP (P.A.R.I.S., 1/20 000<sup>e</sup>). La révélation a été effectuée avec le kit de bioluminescence ECL Plus (GE Healthcare).

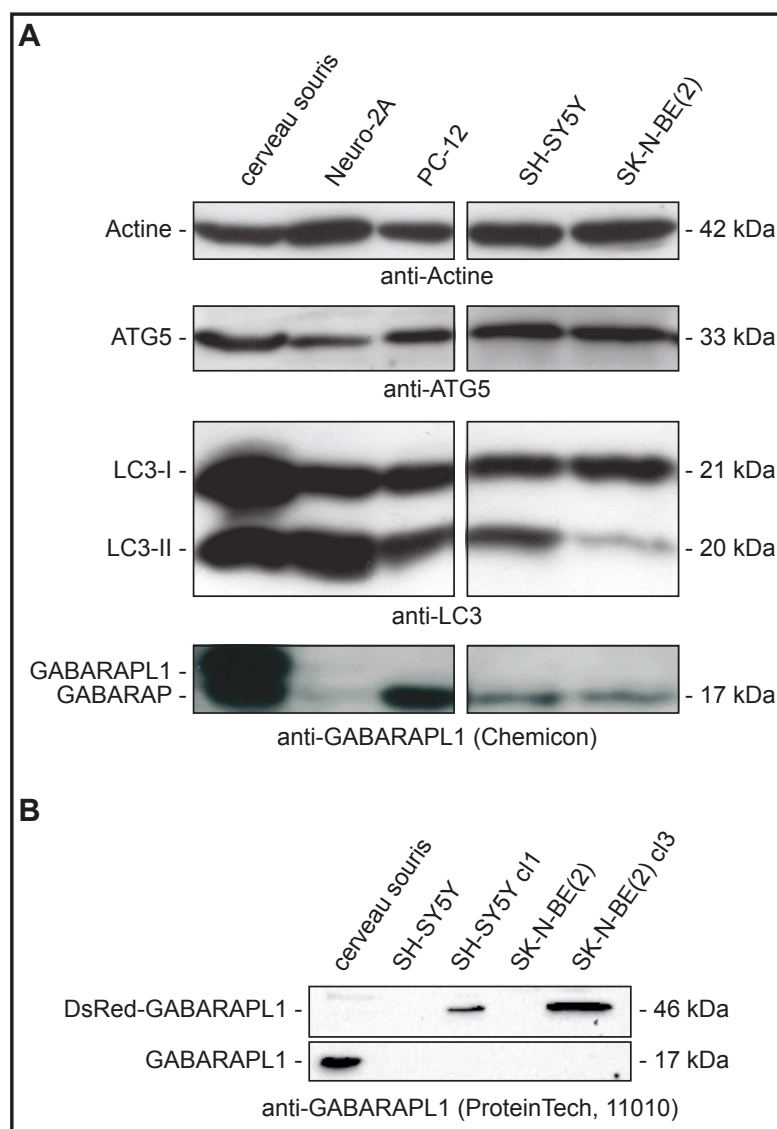
Nous avons donc entrepris une étude du rôle de GABARAPL1 dans des modèles neuronaux cellulaires *in vitro* dans des conditions de stress mitochondriaux liés à la progression des maladies neurodégénératives et décrits pour induire le processus de l'autophagie.

## **1. Etablissement et caractérisation d'une lignée cellulaire stable SK-N-BE(2) exprimant la protéine DsRed-GABARAPL1**

Des études précédentes menées au laboratoire ont démontré que la protéine GABARAPL1 est peu ou pas exprimée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales. Nous avons donc tout d'abord étudié l'expression de cette protéine dans différentes lignées cellulaires tumorales neuronales :

- la lignée dérivée de neuroblastome de souris (Neuro-2A) ;
- la lignée dérivée de phéochromocytome de rat (PC12) ;
- deux lignées dérivées de neuroblastomes humaines (SH-SY5Y et SK-N-BE[2]).

Les protéines totales extraites de ces différentes lignées ont été étudiées par western-blotting avec un anticorps non-spécifique de la protéine GABARAPL1, et qui reconnaît donc GABARAPL1 et GABARAP, ainsi que des anticorps dirigés contre d'autres protéines impliquées dans l'autophagie (anti-Atg5 et anti-LC3) et l'anticorps anti-Actine (**Figure 14A**). Cette étude a montré que les différentes protéines autophagiques sont exprimées à des niveaux variables dans ces différentes lignées. Alors que la protéine ATG5, une protéine nécessaire pour la formation des autophagosomes, est exprimée de manière ubiquitaire, les homologues de la famille ATG8 (GABARAP et LC3) présentent une expression variable dans les différentes lignées étudiées. Bien que la forme cytosolique et la forme mature de la protéine LC3 (LC3-I et LC3-II, respectivement) soient fortement exprimées dans les lignées Neuro-2A, PC12 et SH-SY5Y, l'expression de LC3-II est significativement réduite dans la lignée SK-N-BE(2). La protéine GABARAP, quant à elle, présente une faible expression dans toutes les lignées étudiées sauf la lignée PC12, dans laquelle une forte expression a été détectée. Alors que toutes les lignées neuronales expriment ces marqueurs de l'autophagie, y compris la protéine GABARAP, aucune de ces lignées n'exprime la protéine GABARAPL1.



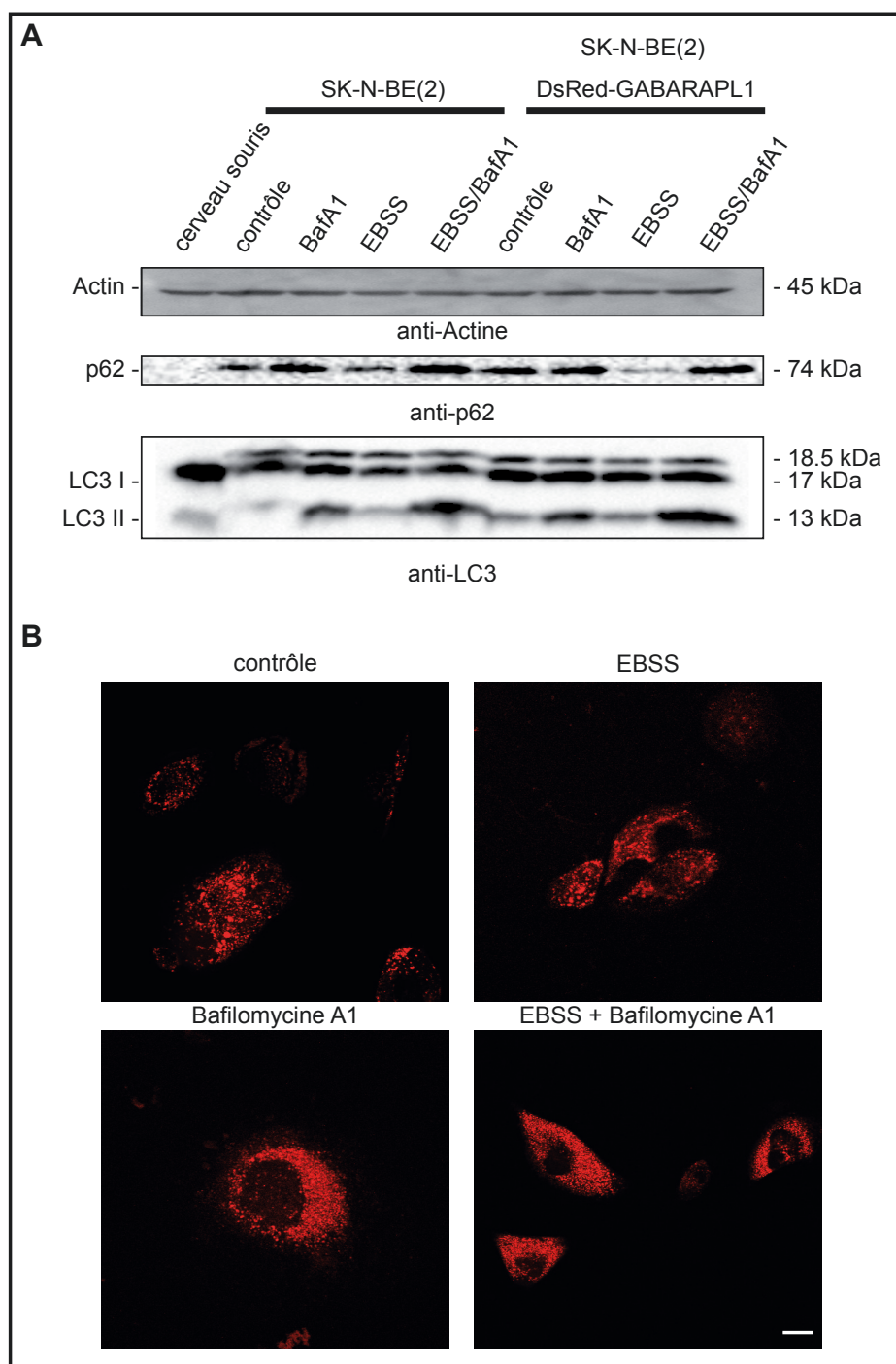
**Figure 14 : Expression de la protéine GABARAPL1 dans différentes lignées cellulaires neuronales et dans deux lignées stables surexprimant DsRed-GABARAPL1.** 20 µg (A) ou 40 µg (B) de protéines totales ont été séparées sur des gels SDS-PAGE 15 % et transférées sur des membranes PVDF. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires suivants : polyclonal anti-Actine (Sigma, 1/3000<sup>e</sup>), polyclonal anti-ATG5 (AbCam, 1/1000<sup>e</sup>), polyclonal anti-LC3 (Novus Biologicals, 1/1000<sup>e</sup>), polyclonal anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore, 1/1000<sup>e</sup>) ou anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group, 1/1000<sup>e</sup>) et les anticorps secondaires suivants: anti-IgG de lapin HRP (P.A.R.I.S., 1/20 000<sup>e</sup>) ou anti-IgG de poulet HRP (Novus Biologicals, 1/10 000<sup>e</sup>). La révélation a été effectuée avec le kit de bioluminescence ECL Plus (GE Healthcare).

Nous avons donc décidé de créer une lignée neuronale surexprimant la protéine GABARAPL1 afin de pouvoir étudier son rôle cellulaire dans un modèle *in vitro*. Pour cette étude, nous avons choisi les deux lignées neuronales humaines n'exprimant pas GABARAPL1, SH-SY5Y et SK-N-BE(2). Les lignées SH-SY5Y ou SK-N-BE(2) surexprimant d'une manière stable la protéine DsRed-GABARAPL1 ont été établies par transfection stable

avec le vecteur pDsRed-GABARAPL1 à partir des cellules sauvages. La sélection des clones stables a été réalisée en présence de 400 µg/ml de G418. La présence de la protéine de fusion DsRed-GABARAPL1 a été ensuite validée par détection d'un signal à la taille attendue de 46 kDa par western-blotting (**Figure 14B**) et par la détection de la protéine DsRed-GABARAPL1 en microscopie à fluorescence.

Les expériences suivantes ont été réalisées en utilisant le modèle de surexpression établi avec les cellules SK-N-BE(2). Après vérification de la présence de la protéine d'intérêt, nous avons étudié le flux d'autophagie dans notre modèle. Pour cela, nous avons incubé les cellules SK-N-BE(2) ou SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 en présence de Bafilomycine A1 (4 h), un composé qui inhibe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes ; d'EBSS (4 h), un inducteur de l'autophagie ; ou d'EBSS et de Bafilomycine A1 (4 h). Nous avons ensuite étudié l'expression des protéines de l'autophagie, p62 et LC3 (**Figure 15A**), puis nous avons, en parallèle, étudié la localisation de la protéine DsRed-GABARAPL1 dans les mêmes conditions par microscopie confocale (**Figure 15B**). Comme le montre la **Figure 15**, les cellules surexprimant DsRed-GABARAPL1 ne présentent pas d'altération du flux d'autophagie. Nous avons en effet observé en western-blotting une augmentation des niveaux des protéines p62 et LC3-II dans les deux lignées après inhibition de la dégradation lysosomale par Baf A1, une diminution des niveaux après induction du flux autophagique par l'EBSS et une augmentation plus importante après induction du flux par EBSS et inhibition de la dégradation des autophagosomes par Baf A1. En ce qui concerne la protéine fluorescente DsRed-GABARAPL1, nous avons observé une relocalisation de la protéine dans les autophagosomes après incubation avec l'inhibiteur du flux autophagique, Baf A1. Ces résultats démontrent que la lignée SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 présente une réponse autophagique comparable à celle de la lignée SK-N-BE(2) sauvage dans les conditions testés.



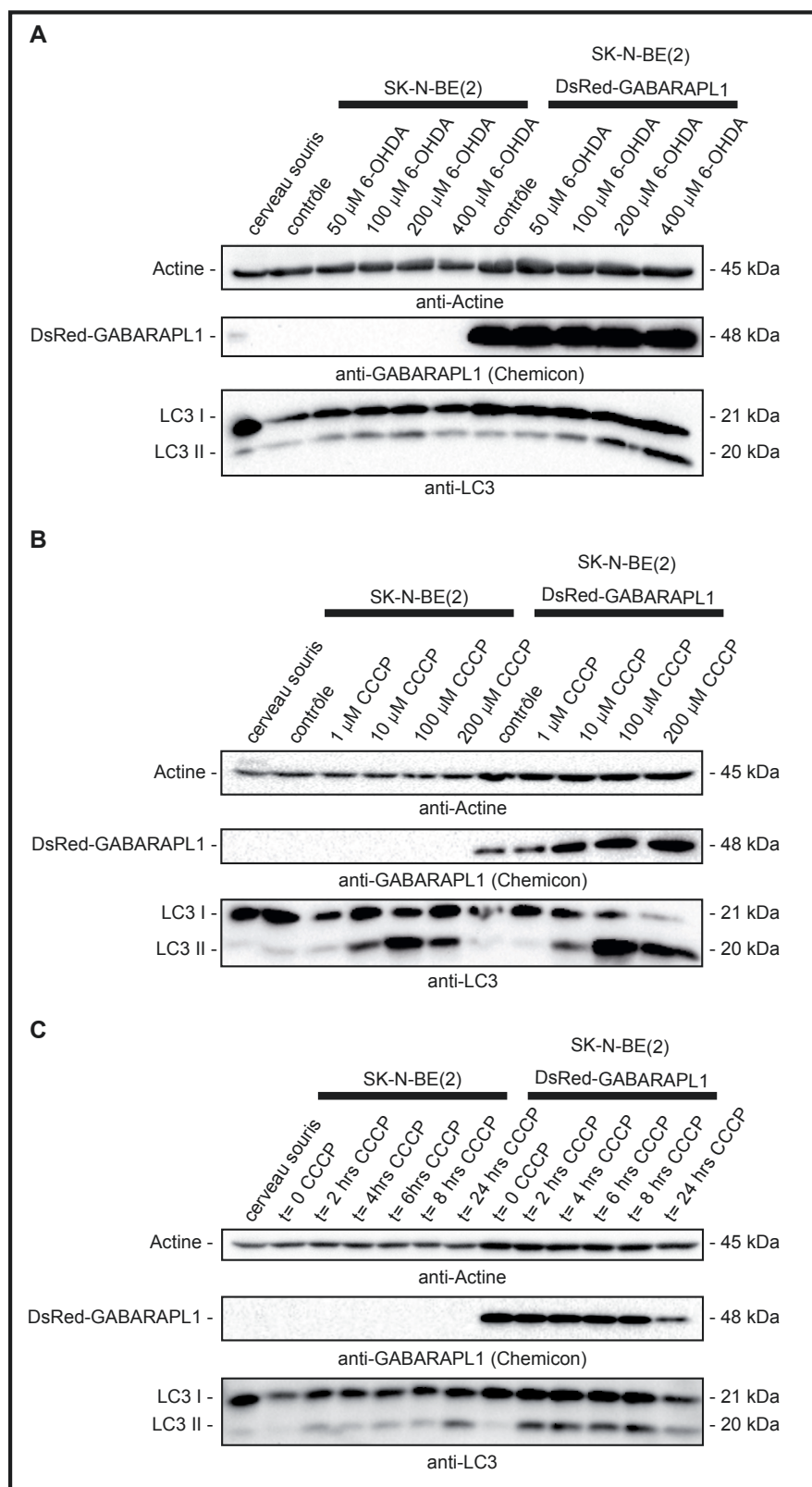


**Figure 15 : Régulation du flux autophagique dans les cellules SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1.** **A)** Les cellules SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 ont été traitées avec de la Bafilomycine A1 (100 nM), de l'EBSS ou de la Bafilomycine A1 et de l'EBSS pendant 4 heures. 35 µg de protéines totales ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 15 % et transférées sur une membrane PVDF. La membrane a ensuite été incubée avec les anticorps primaires : polyclonal anti-Actine (Sigma, 1/3000<sup>e</sup>), monoclonal anti-p62 (Santa Cruz, 1/1000<sup>e</sup>) ou polyclonal anti-LC3 (Novus Biologicals, 1/1000<sup>e</sup>) et les anticorps secondaires anti-IgG de lapin HRP (P.A.R.I.S., 1/20 000<sup>e</sup>) ou anti-IgG de souris HRP (P.A.R.I.S., 1/20 000<sup>e</sup>). La révélation a été effectuée avec le kit de bioluminescence ECL Plus (GE Healthcare). **B)** Les photos des cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 après traitement de 4 heures ont été prises avec le microscope confocal (IX81, Olympus, France) et le logiciel Fluoview FV1000 puis reformatées avec le logiciel Adobe Photoshop CS3. La barre d'échelle représente 10 µm.

## 2. L'étude de la réponse autophagique suite à différents traitements induisant un stress mitochondrial dans les cellules SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1

Au cours de ces expériences, nous avons voulu étudier l'effet de la surexpression de DsRed-GABARAPL1 sur la réponse cellulaire en conditions de stress mitochondriaux. Pour cela, nous avons traité les cellules avec deux composants décrits pour induire un stress mitochondrial : le 6-OHDA (6-hydroxydopamine), une neurotoxine générant des espèces réactives de l'oxygène et inhibant les complexes I et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, et le CCCP (*carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone*), un agent découplant de la chaîne respiratoire mitochondriale. Nous avons ensuite étudié l'expression des protéines Actine, DsRed-GABARAPL1 et LC3 dans les lysats totaux par western-blotting.

Nous avons étudié l'effet de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules sauvages et les cellules surexprimant DsRed-GABARAPL1. Pour cela nous avons incubé les cellules en présence du composant 6-OHDA. Pour ces expériences, les deux lignées cellulaires ont été incubées en présence de 6-OHDA à des concentrations variables (de 50  $\mu\text{M}$  à 400  $\mu\text{M}$ ) pendant 6 heures (**Figure 16A**). Après traitement avec le 6-OHDA à des concentrations plus importantes (200  $\mu\text{M}$  et 400  $\mu\text{M}$ ), les niveaux de la forme phospholipidée de la protéine LC3 (LC3-II) sont augmentés suggérant une induction de l'autophagie dans les cellules SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 après traitement avec le 6-OHDA. En revanche, les taux de la protéine DsRed-GABARAPL1 ne semblent pas varier au cours de ces traitements. De plus, au cours de ces traitements, nous n'avons observé aucune modification du taux d'expression des protéines GABARAP ou GABARAPL1 endogènes.



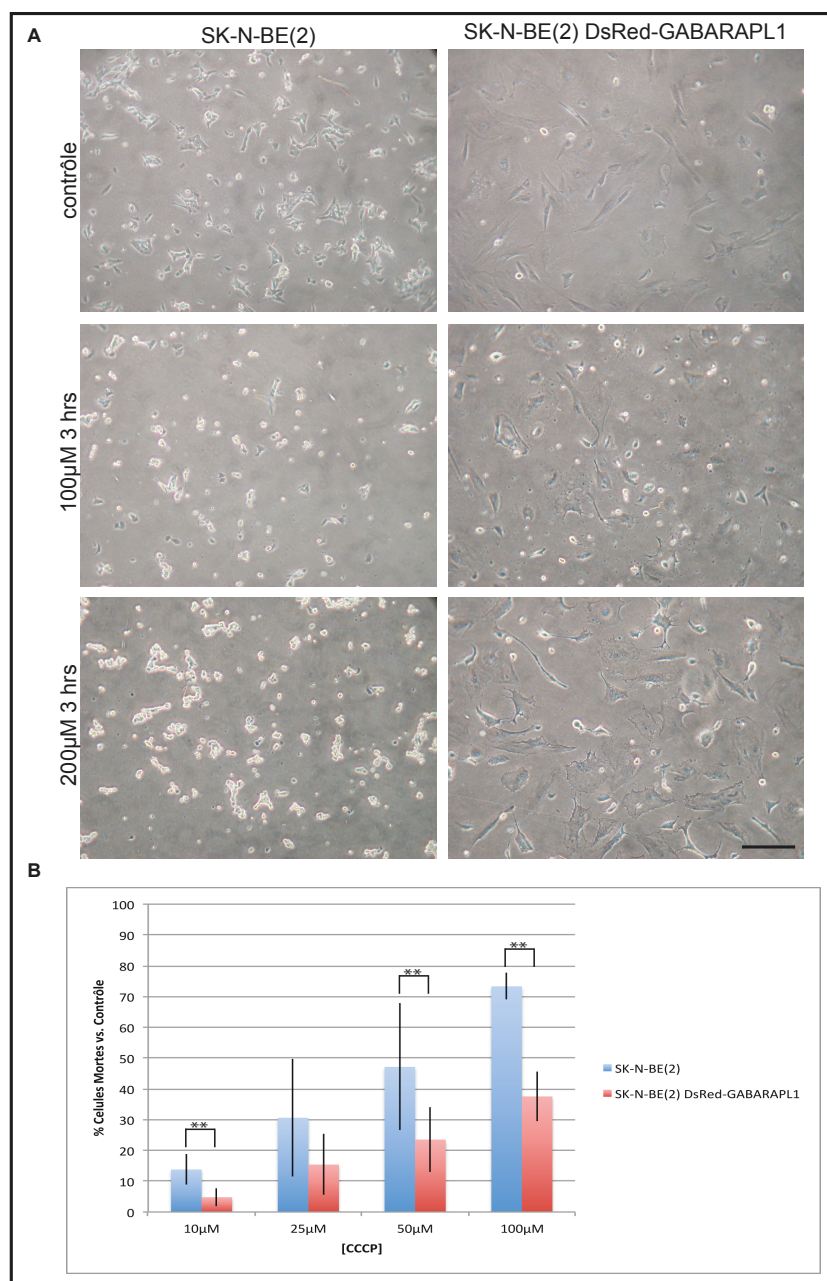
**Figure 16 : Réponse des cellules SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 aux traitements induisant un stress mitochondrial.** Les cellules SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 ont été traitées par **A)** différentes concentrations de 6-OHDA pendant 6 heures, **B)** différentes concentrations de CCCP pendant 3 heures ou **C)** avec 10  $\mu$ M de CCCP pendant 24 heures. 20  $\mu$ g **(A)** ou 40  $\mu$ g **(B et C)** de protéines totales ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 18 % et transférées sur une membrane PVDF. Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires : polyclonal anti-Actine (Sigma, 1/3000<sup>e</sup>), - polyclonal anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore, 1/1000<sup>e</sup>) ou polyclonal anti-LC3 (Novus Biologicals, 1/1000<sup>e</sup>) et les anticorps secondaires anti-IgG de lapin HRP (P.A.R.I.S., 1/20 000<sup>e</sup>) ou anti-IgG de souris HRP (P.A.R.I.S., 1/20 000<sup>e</sup>). La révélation a été effectuée avec le kit de bioluminescence ECL Plus (GE Healthcare).

Ensuite, nous avons induit un stress mitochondrial par incubation des cellules en présence de CCCP pendant 3 heures avec des concentrations variables (1  $\mu$ M à 200  $\mu$ M) ou à

une concentration de 10  $\mu\text{M}$  pendant des durées variables (2 h à 24 h) (**Figure 16B et C**). Comme le montre la **Figure 16**, le CCCP, comme le 6-OHDA, induit l'autophagie dans les cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 ainsi que dans les cellules SN-N-BE(2). Ceci est démontré par une augmentation des niveaux de la protéine LC3-II. Ce qui est plus intéressant est que la forme mature de la protéine LC3 (LC3-II) est augmentée plus précocement dans les cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1, suggérant que l'autophagie est induite plus rapidement dans ces dernières (**Figure 16C**). Par ailleurs, les niveaux de la protéine DsRed-GABARAPL1 sont augmentés après 3 heures de traitement CCCP à des concentrations plus importantes (10  $\mu\text{M}$  à 200  $\mu\text{M}$ ).

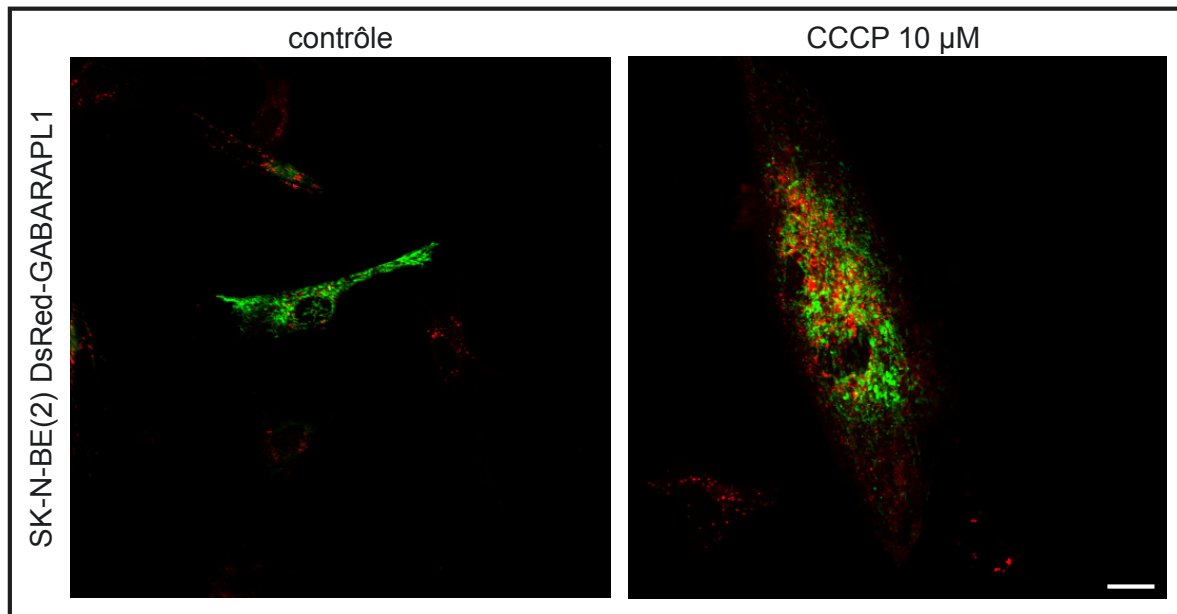
### **3. Effet de la surexpression de GABARAPL1 sur la viabilité cellulaire en conditions de stress mitochondrial**

Suite à ces résultats, nous nous sommes demandés si l'activation plus précoce de l'autophagie dans les cellules stables surexprimant DsRed-GABARAPL1 pouvait protéger les cellules contre la mort cellulaire liée au CCCP. Nous avons donc effectué des expériences de viabilité cellulaire par comptage au Bleu Trypan afin de quantifier le taux de survie des deux lignées après traitement avec du CCCP. Les cellules ont été incubées en présence de CCCP pendant 3 heures à des concentrations variables (10  $\mu\text{M}$  à 100  $\mu\text{M}$ ) avant de récupérer toutes les cellules (adhérentes et flottantes) et de les incuber avec une solution de Bleu Trypan pour déterminer les taux de cellules vivantes. Les résultats ont été exprimés en pourcentages de cellules mortes dans les puits traités au CCCP normalisés par rapport au nombre de cellules mortes dans les puits contrôles. Comme on peut le constater sur la **Figure 17**, les deux lignées cellulaires présentent un fort taux de mort cellulaire après traitement au CCCP. En revanche, le taux de mort est significativement plus faible dans les cellules surexprimant DsRed-GABARAPL1, suggérant que cette protéine pourrait protéger contre la mort cellulaire induite par le stress mitochondrial.



**Figure 17 : Test de viabilité cellulaire des lignées SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 après un traitement au CCCP.** Les cellules SK-N-BE(2) et SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 ont été traitées par différentes concentrations de CCCP pendant 3 heures. **A)** Photographie des cellules sauvages et stables en microscopie de contraste de phase (microscope Nikon TMS) après traitement au CCCP. **B)** Test de viabilité cellulaire au Bleu Trypan: la totalité des cellules (flottantes et adhérentes) ont été collectées puis incubées avec du Bleu Trypan. Les barres d'erreurs correspondent à la déviation standard. Les valeurs statistiques significatives ont été calculées avec le logiciel GraphPad PRISM à l'aide d'un test de Student bilatéral avec une  $p < 0,01$  (\*\*) ou  $p < 0,05$  (\*),  $n=6$ . La barre d'échelle représente 50 µm.

Compte-tenu du fait que GABARAPL1 peut interagir avec l'adaptateur mitochondrial NIX pour cibler les mitochondries endommagées vers les autophagosomes, nous avons étudié la co-localisation de ces deux protéines après traitement au CCCP. Pour cela, nous avons transfecté les cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 avec le vecteur pGFP-NIX puis nous avons incubé ces cellules en présence de 10 µM de CCCP pendant 3 heures. Les résultats préliminaires, représentés dans la **Figure 18**, suggèrent une augmentation de l'expression de la protéine DsRed-GABARAPL1 dans des vésicules à proximité de vésicules marquées par la protéine GFP-NIX après incubation avec le CCCP.



**Figure 18 : Etude de la localisation de GFP-Nix et DsRed-GABARAPL1 après un traitement au CCCP.** Les cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 ont été transfectées par le plasmide pGFP-Nix puis traitées avec 10  $\mu\text{M}$  CCCP pendant 3 heures. Les photos ont été prises avec le microscope confocal (IX81, Olympus, France) et le logiciel Fluoview FV1000 puis traitées avec le logiciel Adobe Photoshop CS3. La barre d'échelle représente 20  $\mu\text{m}$ .



# **DISCUSSION**

---





Mon projet de thèse s'est concentré sur l'étude de la protéine GABARAPL1 dans le SNC et dans un modèle de stress mitochondrial neuronal. Dans un premier temps, j'ai étudié la spécificité des anticorps anti-GABARAPL1 afin d'identifier un anticorps spécifique de cette protéine. Ce nouvel outil m'a permis de cartographier l'expression de la protéine GABARAPL1 dans le SNC murin adulte et embryonnaire et d'identifier les types de neurones qui expriment GABARAPL1. Nous avons observé une forte expression de GABARAPL1 particulièrement dans des neurones associés à tous les grands systèmes du SNC, incluant de nombreux types de neurones corticaux, les neurones cholinergiques du pallidum, les neurones dopaminergiques de la substance noire ou encore les cellules de Purkinje. Dans un deuxième temps, j'ai participé aux travaux de thèse menés au sein de l'équipe par Fatima Chakrama sur le rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie. Ce projet a démontré le rôle de GABARAPL1 dans la formation des autophagosomes. La forte expression de GABARAPL1 dans les types de neurones souvent associés à des pathologies spécifiques du SNC et son rôle au cours de l'autophagie m'ont amenée à établir un nouveau modèle cellulaire neuronal surexprimant la protéine GABARAPL1. Ce modèle a permis d'étudier le rôle de GABARAPL1 dans des conditions de stress mitochondriaux pouvant induire l'autophagie et intervenant lors de la progression des maladies neurodégénératives.

## I Expression de GABARAPL1 dans le système nerveux central

En 2003, notre équipe a étudié l'expression des gènes *gabapap1* et *gabapap* dans 76 tissus humains différents (Nemos *et al.*, 2003). Il a ainsi été montré que *gabapap1* est exprimé dans les tissus humains à des taux variables et que la plus forte expression de transcrits est visible dans le SNC et le cœur. Dans ces tissus, l'expression de *gabapap1* est plus importante que celle de *gabapap*. Une étude complémentaire a été effectuée pour examiner par RT-PCR quantitative l'expression des différents membres de la famille *atg8* (*gabapap*, *gabapap1*, *gabapap2* et *lc3*) dans différentes aires cérébrales (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006). Les résultats ont démontré que le gène *gabapap1* est le plus exprimé de tous les membres de la famille *atg8* dans toutes les aires du cerveau et que son expression est particulièrement élevée dans le tronc cérébral et le diencephale. Finalement, une cartographie détaillée de l'expression de l'ARNm *gabapap1*, réalisée dans le SNC de rat, a révélé une forte expression de *gabapap1* dans des régions contenant des neurones impliqués dans les fonctions motrices et neuroendocrines (Tolle *et al.*, 2008).

Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé de compléter l'étude de l'expression du gène *gabaryl1* en établissant une cartographie précise de la protéine GABARAPL1 dans le SNC murin chez l'adulte et chez l'embryon. Au cours de cette étude, nous avons démontré que GABARAPL1 est exprimée dans le cerveau murin à partir du 11<sup>e</sup> jour du développement embryonnaire et qu'elle augmente jusqu'à un taux six fois plus élevé au 17<sup>e</sup> jour. Le niveau d'expression reste toutefois significativement inférieur à celui observé chez l'adulte. Alors que l'expression de GABARAPL1 est visible dans les neurones immatures et les tractus de fibres neuronales chez l'embryon, elle est observée principalement dans le péricaryon de neurones matures chez l'adulte. GABARAPL1 est exprimée dans tout le cerveau murin mais son niveau d'expression, comme celui de son ARNm, est variable dans les différentes populations de neurones. Finalement, au niveau cellulaire, le marquage de GABARAPL1 est faible et diffus dans le cytoplasme avec un plus fort marquage ponctiforme de type vésiculaire. Des expériences *in vitro* de cultures corticales primaires ont démontré qu'une grande proportion de ces vésicules correspondent à des vésicules autophagiques.

## 1.1 Expression de GABARAPL1 chez l'embryon de souris

Chez l'embryon, l'expression de GABARAPL1 est visible dans les neurones immatures ainsi que dans les tractus de fibres neuronales mais est absente des zones contenant des précurseurs neuronaux telles que la zone ventriculaire et la zone sous-ventriculaire. A ce titre, l'expression de GABARAPL1 semble être absente dans les cellules progénitrices neuronales prolifératives mais est détectée dans les neurones nouvellement différenciés et leurs prolongements axonaux.

### 1.1.1 GABARAPL1 et prolifération cellulaire

Au laboratoire, il a été démontré que la surexpression de la protéine GABARAPL1 dans des lignées cellulaires MCF-7 conduit à l'inhibition de leur prolifération alors qu'elle induit une augmentation de prolifération cellulaire dans les cellules HEK293 (Chakrama, 2011). En outre, *gabaryl1* est régulé positivement par les facteurs de transcription FOXO qui régulent également des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Accili and Arden, 2004). Etant donné que nous avons observé un manque d'expression de GABARAPL1 dans les cellules progénitrices neurales, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle l'expression de GABARAPL1 dans des lignées neuronales, telles que les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y ou SK-N-BE(2), pourrait induire une inhibition de prolifération,

similaire à celle observée dans la lignée du cancer du sein, MCF-7. Afin de vérifier cette hypothèse, les lignées neuronales SH-SY5Y et SK-N-BE(2) surexprimant la protéine DsRed-GABARAPL1 ont été créées dans le cadre de ma thèse. Une étude de l'effet de la surexpression de DsRed-GABARAPL1 sur la prolifération de ces cellules est actuellement en cours.

### 1.1.2 GABARAPL1 et différenciation neuronale

Chez la souris, la neurogenèse commence à partir du 9<sup>e</sup> jour embryonnaire avec la différenciation des neurones des noyaux moteurs crâniens (Finlay and Darlington, 1995) et augmente durant le développement jusqu'aux premiers jours après la naissance. L'augmentation progressive de l'expression de GABARAPL1 semble donc corrélée avec la progression de la différenciation neuronale.

A ce jour, il y a peu d'études sur l'expression des ATG au cours du développement. Néanmoins, l'autophagie neuronale a été proposée pour jouer un rôle important au cours du développement. Ainsi, les souris invalidées pour le gène autophagique *ambra1* montrent des anomalies graves du tube neural associées à une diminution du flux autophagique, qui induit une augmentation de la prolifération cellulaire à des stades précoces (E8.5) suivie par la mort cellulaire apoptotique vers E9 et une dérégulation de la différenciation neuronale plus tardivement (Fimia *et al.*, 2007). De plus, un rôle de l'autophagie dans la différenciation neuronale a été récemment décrit dans le bulbe olfactif et dans des cultures primaires de cellules souches ou progénitrices du bulbe olfactif embryonnaire de souris (eOBSC, pour *embryonic olfactory bulb stem cells*) (Vazquez *et al.*, 2012). En effet, l'expression des gènes autophagiques *atg7*, *beclin1*, *lc3* et *ambra1* est augmentée au cours de la différenciation neuronale *in vivo* dans les neurones mitraux du bulbe olfactif. De plus, l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine ou par la wortmannine diminue le nombre de neurones différenciés au cours d'expériences *in vitro*. L'autophagie semble également être impliquée dans le remodelage neuronal. Ceci a été démontré par une réduction de la croissance de neurites en l'absence de l'autophagie. En effet, le nombre de neurites formés est réduit sous des conditions qui inhibent l'autophagie telles que :

- une perte d'activité d'ULK1 (par infection rétrovirale d'une forme dominante négative d'ULK1) *in vitro* et *in vivo* (Tomoda *et al.*, 1999) ;

- dans les cultures primaires de cellules eOBSC dérivées des souris invalidées pour le gène *atg5* ;
- ou après l'inhibition du processus d'autophagie par la 3-méthyladénine dans les cellules eOBSC *in vitro* (Vazquez *et al.*, 2012).

Il est donc possible que l'augmentation progressive de l'expression de la protéine GABARAPL1 au cours du développement du SNC puisse être indicative d'une augmentation de la transcription de son gène et d'un besoin de cette protéine dans la différenciation neuronale. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des transcrits *gabarapl1* au cours du développement neuronal chez l'embryon *in vivo* afin de vérifier si l'augmentation de l'expression de la protéine GABARAPL1 résulte bien d'une augmentation d'expression de son ARNm. Il serait également intéressant d'examiner l'implication de GABARAPL1 et des membres de la sous-famille GABARAP dans la différenciation neuronale dans des modèles *in vitro* exprimant ou pas ces protéines pour déterminer si elles sont également requises pour la différenciation et le remodelage des neurones. Il serait également intéressant de suivre le niveau d'expression global de GABARAPL1 durant le développement post-natal ainsi que d'étudier l'expression des autres membres de la famille ATG8 durant le développement dans le SNC. Ces études concernant l'expression de la protéine GABARAPL1, GABARAP et LC3 au cours du développement murin embryonnaire et postnatale sont actuellement en cours.

## 1.2 Expression de GABARAPL1 chez la souris adulte

En accord avec ce qui a été décrit pour son ARNm (Tolle *et al.*, 2008), GABARAPL1 est exprimée dans toutes les aires cérébrales étudiées mais son expression est spécifique des neurones. L'étude de l'expression de GABARAPL1 dans le cerveau adulte murin a démontré que cette protéine est plus ou moins exprimée en fonction de la région examinée. Globalement, GABARAPL1 est plus fortement exprimée dans les neurones impliqués dans les fonctions motrices ou les fonctions neuro-endocrines et moins exprimée dans ceux impliqués dans les fonctions sensorielles.

La littérature sur GABARAPL1 suggère deux hypothèses principales sur le rôle de GABARAPL1 dans le cerveau : le transport de récepteurs neuronaux tels que les récepteurs GABA<sub>A</sub> et les récepteurs aux  $\kappa$ -opioïdes ou le processus autophagique.

### 1.2.1 Le transport de récepteurs neuronaux par GABARAPL1

GABARAPL1 est capable de se lier aux récepteurs  $\kappa$ -opioïdes et aux microtubules pour participer au transport de ces récepteurs à la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2006). L'activation des récepteurs aux  $\kappa$ -opioïdes entraîne divers effets physiologiques impliqués dans l'antinociception, la diurèse et la mémorisation (VonVoigtlander *et al.*, 1983; Pfeiffer *et al.*, 1986; Dykstra *et al.*, 1987). Chez le rat, ces récepteurs sont exprimés préférentiellement dans l'hypothalamus et le striatum et à des faibles niveaux dans le thalamus, l'hippocampe et le cortex (Maggi *et al.*, 1989). GABARAPL1 est très faiblement exprimée dans le striatum mais présente une forte expression dans l'hypothalamus, l'hippocampe et le cortex. Les niveaux d'expression de GABARAPL1 dans ces régions ne sont donc pas corrélés avec les niveaux d'expression des récepteurs aux  $\kappa$ -opioïdes.

GABARAPL1 peut aussi interagir avec la sous-unité  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub>, suggérant son implication dans le transport de ce récepteur à la membrane plasmique (Mansuy *et al.*, 2004). GABA est un neurotransmetteur qui se lie aux récepteurs GABA<sub>A</sub> pour produire un afflux d'ions chlorures dans la cellule conduisant à une hyperpolarisation et donc à une inhibition de la neurotransmission. GABA et les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont les neurotransmetteurs et les récepteurs inhibiteurs les plus répandus dans le SNC. Cependant, les afférences GABAergiques ne correspondent pas à l'expression différentielle de GABARAPL1 dans les régions du cerveau. En effet, alors qu'une forte expression de GABARAPL1 est visible dans les neurones GABAergiques de Purkinje dans le cervelet, son expression est beaucoup moins forte dans les neurones granulaires du cervelet, qui expriment également des récepteurs GABA<sub>A</sub>. En revanche, le niveau d'expression de GABARAPL1 pourrait se traduire par une modulation du transport de ces deux récepteurs dans les différentes régions cérébrales. Il serait ainsi intéressant d'étudier la co-localisation de GABARAPL1 avec les deux récepteurs afin de vérifier s'ils sont co-localisés dans les mêmes populations neuronales. De plus, il serait intéressant d'effectuer des expériences d'électrophysiologie sur les différentes populations qui expriment plus ou moins GABARAPL1 afin d'examiner la possibilité d'un lien entre le niveau d'expression de GABARAPL1 et la capacité de ces neurones à répondre aux stimuli inhibiteurs par les afférents GABAergiques.

Par ailleurs, il a été démontré que les récepteurs aux  $\kappa$ -opioïdes se lient préférentiellement avec GABARAPL1, comparativement à ses homologues, GABARAP et

GABARAPL2 (Chen *et al.*, 2009). Plus important encore, contrairement à GABARAP, le clivage de GABARAPL1 en aval de la glycine en position 116 n'est pas requis pour sa participation au transport de ces récepteurs (Chen *et al.*, 2011). Il serait intéressant dans de futures études de déterminer si ce clivage intervient lors du transport du récepteur GABA<sub>A</sub>. Ces résultats seraient en particulier bénéfiques pour l'étude du rôle de GABARAPL1 dans le processus autophagique sans affecter son rôle dans le transport du récepteur. En effet, si ce clivage n'est pas nécessaire pour le transport des récepteurs, nous pourrions ainsi étudier le rôle de GABARAPL1 dans le processus d'autophagie, grâce à l'inhibition de sa phospholipidation en mutant la glycine en position 116 en alanine, sans affecter le rôle de la protéine dans le transport neuronal.

### 1.2.2 GABARAPL1 et l'autophagie neuronale

Un taux d'autophagie basal est essentiel à la maintenance de l'homéostasie des neurones du SNC. En effet, un fort taux de neurodégénérescence a été mis en évidence dans les souris invalidées pour les gènes autophagiques *fip200*, *atg5* ou *atg7* au niveau du SNC (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent qu'il puisse y avoir un certain niveau d'expression des marqueurs autophagiques dans le cerveau normal. Toutefois, les expériences effectuées jusqu'à ce jour ne permettent pas de détecter des niveaux significatifs de ces marqueurs dans le cerveau. En effet, alors qu'une accumulation de p62 est visible dans les cerveaux des modèles de neurodégénérescence, cette protéine semble être indétectable dans le cerveau normal (Friedman *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2012). De plus, chez la souris GFP-LC3, l'expression de LC3 dans le cerveau paraît diffuse dans le cytoplasme et ne présente pas un marquage ponctiforme caractéristique des vésicules autophagiques (Mizushima *et al.*, 2004; He *et al.*, 2012). D'autres études ont également démontré une absence de marquage ponctiforme de LC3 dans le cerveau sain (Mann and Hammarback, 1996; Koike *et al.*, 2005; Schaeffer *et al.*, 2012). Par ailleurs, certaines études ont démontré une absence de conversion de LC3-I en LC3-II dans le cerveau après l'activation de l'autophagie, comme dans les noyaux moteurs de la moelle épinière après un traitement au tréhalose (Schaeffer *et al.*, 2012) ou dans le cortex après un exercice induisant l'autophagie (He *et al.*, 2012). Cette absence de marquage de protéines autophagiques dans le cerveau résulte probablement d'un flux d'autophagie important dans cet organe, conduisant à une dégradation trop rapide des autophagosomes et empêchant la détection de ces constituants (Lee, 2012). Cependant, l'absence d'un marquage ponctiforme

de LC3 pourrait suggérer que la formation de vésicules autophagiques est principalement contrôlée par un autre membre de la famille ATG8 dans le cerveau, tel que GABARAPL1.

Nous avons montré dans notre étude que la protéine GABARAPL1 est détectable par immunofluorescence dans le cerveau adulte de souris saines. Ces résultats sont en accord avec les études montrant que l'ARNm *gabarapl1* est le plus exprimé dans le cerveau parmi tous les membres de la famille *atg8* (Mansuy-Schlick *et al.*, 2006). De plus, dans nos études, la protéine GABARAPL1 présente un marquage ponctiforme dans les cellules du cerveau et également dans des neurones primaires. Contrairement aux tissus, un marquage ponctiforme de p62 et LC3 peut être détecté dans les cultures primaires de neurones. Ceci pourrait indiquer un besoin plus important de l'autophagie pour fournir des nutriments dans des cellules neuronales en absence des cellules de support comme les astrocytes. Dans les cultures primaires, nous avons observé une accumulation du marquage GABARAPL1 et une co-localisation partielle de celle-ci avec le marqueur autophagique p62 après inhibition de la dégradation des autophagosomes par la Baf A1. Ces expériences suggèrent que les vésicules marquées par p62 et GABARAPL1 représenteraient des autophagosomes. La protéine GABARAPL1 pourrait donc être l'homologue d'ATG8 le plus important pour le contrôle de la voie autophagique dans le cerveau. Il sera important dans le futur d'étudier la conversion de GABARAPL1-I en GABARAPL1-II ainsi que sa localisation par immunohistochimie dans les différents modèles qui affectent le flux autophagique dans le cerveau.

Cette hypothèse selon laquelle GABARAPL1 aurait un rôle majeur lors de l'autophagie neuronale est également étayée par le fait que cette protéine est fortement impliquée dans l'autophagie sélective, un processus très important dans le maintien de l'homéostasie dans les neurones post-mitotiques. En effet, les neurones sont des cellules post-mitotiques et sont particulièrement sensibles aux effets de l'accumulation des agrégats protéiques ou de ROS générées par les mitochondries endommagées. En plus de son rôle essentiel au cours de la formation de l'autophagosome, GABARAPL1 semble aussi jouer un rôle important dans le ciblage des protéines ou des organites endommagés au cours de l'autophagie sélective pour maintenir l'homéostasie neuronale. De plus, une étude récente a démontré que la protéine NIX, qui se lie aux membranes mitochondriales lors de leur dépolarisation, interagit préférentiellement avec GABARAPL1 par rapport aux autres membres de la sous-famille GABARAP (Novak *et al.*, 2010). Il sera donc important dans le futur d'identifier de nouvelles



protéines adaptatrices démontrant une préférence pour GABARAPL1 afin de pouvoir examiner l'importance de cette interaction dans le SNC et les maladies neurodégénératives.

L'étude des fonctions spécifiques de la protéine GABARAPL1 dans l'organisme ou dans le cerveau pourrait être abordée en créant une lignée de souris invalidées pour *gabrapl1* ou une lignée de souris invalidées pour *gabrapl1* spécifiquement dans le SNC. Cependant, la forte identité de séquences et de structures entre les membres de la sous-famille GABARAP est probablement liée à une redondance des fonctions de ses membres. En effet, la création d'une lignée de souris invalidée pour le gène *gabrap* n'a pas mis en évidence de phénotype anormal (O'Sullivan *et al.*, 2005). Dans cette étude, les auteurs ont montré une localisation normale des récepteurs GABA<sub>A</sub>, suggérant que les autres membres de la sous-famille GABARAP, et en particulier GABARAPL1, pourraient compenser la perte d'expression de cette protéine. La création d'une souris invalidée pour les gènes *gabrap* et *gabrapl1* sera sûrement nécessaire pour étudier le rôle de ces deux protéines dans le transport des récepteurs neuronaux mais aussi dans le processus de d'autophagie.

### 1.2.3 Expression de GABARAPL1 dans les noyaux moteurs et la *substantia nigra pars compacta* (SNpc)

L'expression de GABARAPL1 dans le SNC adulte semble être liée aux systèmes de contrôle des fonctions motrices. En effet, GABARAPL1 est fortement exprimée dans l'ensemble des neurones impliqués dans les voies somato-motrices. Une forte expression de GABARAPL1 est visible dans les couches 5 et 6 du cortex cérébral et les noyaux moteurs (le circuit pyramidal), le thalamus et la substance noire compacte (le circuit extrapyramidal), le noyau rouge, le noyau gris du pont, les cellules de Purkinje, le complexe inférieur olivaire et le noyau vestibulaire efférent (circuit du cervelet).

La forte expression de GABARAPL1 dans les neurones dopaminergiques de la *substantia nigra pars compacta* est particulièrement intéressante car le gène *gabrapl1* semble être régulé dans cette structure au cours de la progression de la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est caractérisée par la perte de neurones dopaminergiques au niveau du système nigrostriatal. Elle est associée à une diminution d'inhibition GABAergique et à une augmentation de l'excitation des neurones situés dans la substance noire et les ganglions de la base (Calabresi *et al.*, 2000). Au laboratoire, nous avons observé une augmentation d'expression de GABARAPL1 dans un lysat total du cerveau

provenant d'un patient atteint de la maladie de Parkinson. En revanche, l'expression de l'ARNm *gabarapl1* est diminuée dans les neurones dopaminergiques isolés des patients atteints de cette maladie (Simunovic *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant dans le futur de déterminer s'il existe une corrélation entre l'expression des transcrits *gabarapl1* et l'expression de la protéine dans la substance noire compacte de modèles de la maladie de Parkinson. Notre cartographie de GABARAPL1 dans le cerveau murin sera un outil précieux pour comparer les niveaux d'expression de GABARAPL1 dans notre modèle et dans un modèle neurodégénératif de la maladie de Parkinson.

L'implication de la dérégulation de l'expression du gène et de la protéine GABARAPL1 dans la maladie de Parkinson n'a pas encore été déterminée. Néanmoins, il existe plusieurs hypothèses. Dans un premier temps, il a été démontré que la voie de signalisation WNT/ $\beta$ -caténine présente une activité anormalement élevée qui est associée à la mort neuronale dans le mésencéphale ventral des souris invalidées pour le gène *parkin* (modèle murin de la maladie de Parkinson) (Rawal *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que PARKIN peut inhiber cette voie de signalisation en induisant l'ubiquitinylation et la dégradation de la protéine  $\beta$ -caténine. La protéine GABARAPL1 régule aussi cette voie de signalisation, en amont de PARKIN/ $\beta$ -caténine, par la dégradation autophagique de la protéine DVL2 (Zhang *et al.*, 2011). La perte d'expression de la protéine DVL2 libère la protéine GSK3 (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), permettant la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. La forme phosphorylée de la  $\beta$ -caténine est ensuite ubiquitinylée et est dégradée par le protéasome (Berwick and Harvey, 2012). La diminution d'expression de *gabarapl1* dans la substance noire *pars compacta* pourrait donc expliquer que l'augmentation d'activité de la voie WNT/ $\beta$ -caténine soit associée à la mort des neurones dopaminergiques dans cette région.

GABARAPL1 peut également s'associer avec l' $\alpha$ -synucléine, mais présente une affinité plus élevée pour les oligomères de cette protéine que pour la forme monomérique (Schnack *et al.*, 2008). Les agrégats d' $\alpha$ -synucléine sont accumulés dans les corps de Lewy, détectés dans la substance noire lors de la progression de la maladie de Parkinson. Étant donné son rôle dans la dégradation autophagique spécifique des protéines et des organites endommagés, GABARAPL1 pourrait se lier aux oligomères d' $\alpha$ -synucléine et induire leur ciblage vers les autophagosomes. Une diminution de GABARAPL1 dans la substance noire pourrait donc entraîner une accumulation de ces oligomères dans les corps de Lewy.

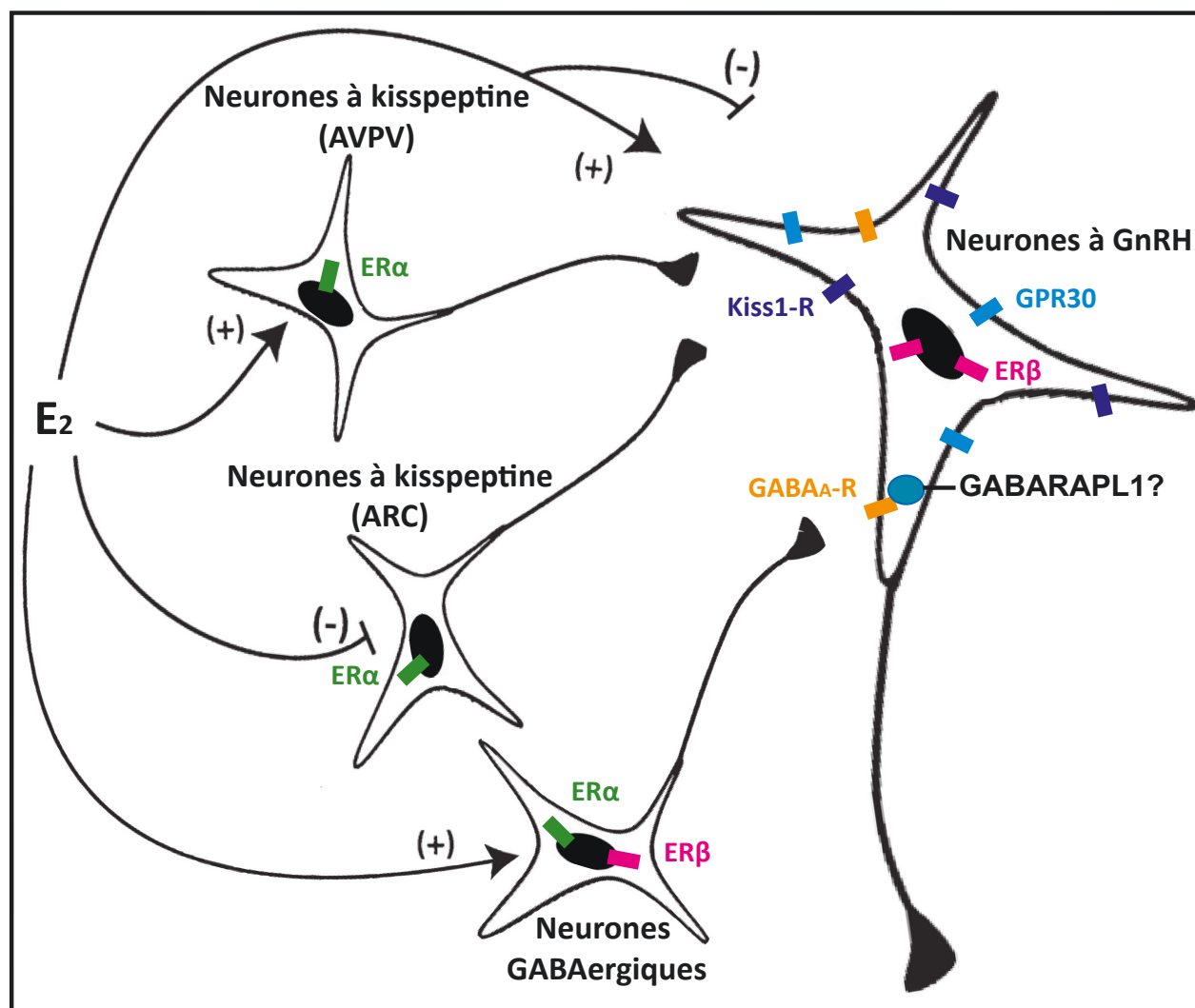
Finally, it has been demonstrated that estrogens present a protective effect in a murine model of Parkinson's disease (mice treated with MPTP) (Bourque et al., 2009). As *gabarapl1* is a gene positively regulated by estrogens, its expression could be increased after this hormonal treatment. The increase of the expression of GABARAPL1 could therefore promote the degradation of proteins, such as oligomers of  $\alpha$ -synuclein or DVL2, and explain in part the protective effect of estrogens. It would therefore be interesting to study further the effect of estrogens and the regulation of *gabarapl1* in models of Parkinson's disease. Similarly, it could also be interesting to use a GABARAPL1 KO mouse or a GABARAP/GABARAPL1 double-KO mouse for these studies in order to examine the relative importance of these proteins in the protein degradation process of  $\alpha$ -synuclein and DVL2.

#### 1.2.4 Expression de GABARAPL1 dans l'hypothalamus et les neurones à GnRH

GABARAPL1 is also strongly expressed in the hypothalamus, particularly in the median preoptic nuclei, paraventricular, mammillary, the arcuate nucleus and the lateral hypothalamus. The hypothalamus, a structure of the diencephalon, contains the neurons involved in neuroendocrine functions. In the preoptic area of the hypothalamus, one finds the GnRH neurons (*gonadotropin-releasing hormone*), a population of neurons involved in the control of the gonadotrophic axis. These neurons produce and secrete the GnRH hormone in the hypothalamo-hypophysary system and this hormone acts on the anterior pituitary cells to trigger the synthesis and secretion of the luteinizing hormone (LH) and the follicle-stimulating hormone (FSH) (Christensen et al., 2012). This system is subject to positive and negative feedback loops involving estrogens (Petersen et al., 2003; Malyala et al., 2005) (**Figure 19**). The control of GnRH neurons by estrogens can pass through indirect pathways involving the signaling of afferent neurons that express estrogen receptors, ER $\alpha$ . For example, the kisspeptin neurons in the paraventricular anterior nucleus (AVPV) and the arcuate nucleus (ARC), respectively, are involved in the positive and negative feedback loops of GnRH neurons in mice (Smith et al., 2005; Smith et al., 2006; Clarkson et al., 2008). More recent studies suggest that GnRH neurons can be directly regulated by estrogens. In fact, GnRH neurons in rodents and humans express estrogen receptors, ER $\beta$  and GPR30 (*G-protein coupled receptor*

30) (Hrabovszky et al., 2001; Legan and Tsai, 2003; Hrabovszky et al., 2007; Noel et al., 2009; Sun et al., 2010). Par ailleurs, les estrogènes régulent la transcription dans les lignées cellulaires neuronales exprimant la GnRH (les cellules GT1-7 et GN11) par un mécanisme dépendant de l'expression d'ER $\beta$  (Roy et al., 1999; Ng et al., 2009). De plus, un agoniste du récepteur ER $\beta$  augmente la signalisation GABAergique ainsi que la réponse post-synaptique à GABA $_A$  dans les neurones à GnRH (Herbison and Fenelon, 1995; Romano et al., 2008; Chu et al., 2009; Ciechanowska et al., 2009; Moenter and Chu, 2012).

Nous avons observé que GABARAPL1 est fortement exprimée dans l'aire préoptique de l'hypothalamus et il a été précédemment démontré que le transcrit *gabrapl1* est fortement exprimé dans l'hypothalamus et plus particulièrement dans les neurones à GnRH (Tolle *et al.*, 2008; Mansuy *et al.*, 2009). Le gène *gabrapl1* est régulé positivement et précocement par les estrogènes dans l'endomètre et l'hypothalamus de cobaye (Vernier-Magnin *et al.*, 2001; Malyala *et al.*, 2004). De plus, la protéine GABARAPL1 est probablement impliquée dans la régulation du transport du récepteur GABA $_A$  (Mansuy *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats suggère que GABARAPL1 pourrait être impliquée dans la réponse aux estrogènes des neurones à GnRH mais son rôle exact n'est toujours pas clair. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression et le rôle de GABARAPL1 dans le trafic des récepteurs GABA $_A$  dans les neurones du système hypothalamo-hypophysaire *in vivo* et dans les neurones à GnRH *in vitro* après traitement aux estrogènes.



**Figure 19 : Schéma sur l'expression des récepteurs impliqués dans la régulation des neurones à GnRH par les estrogènes.** Les neurones à kisspeptine dans le noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) et le noyau arqué (ARC) régulent positivement et négativement des neurones à GnRH, respectivement. Les neurones GABAergiques participent également à la régulation des neurones à GnRH. Les récepteurs aux estrogènes, ER $\beta$  et GPR30, exprimés dans les neurones à GnRH, pourraient médier la réponse directe de ces neurones aux estrogènes. Le rôle de GABARAPL1 dans la régulation des neurones à GnRH par les estrogènes n'est pas encore clair.

## II GABARAPL1 et stress mitochondrial

De nombreuses équipes de recherches s'intéressent au processus d'autophagie dans des conditions physiologiques normales mais également lors du développement de nombreuses pathologies comme les maladies neurodégénératives. En effet, une caractéristique des maladies neurodégénératives est l'accumulation d'inclusions neuronales contenant des agrégats de protéines au niveau des corps de Lewy dans la maladie de

Parkinson (Spillantini et al., 1997), au niveau des inclusions dans la maladie de Huntington (DiFiglia et al., 1997) et au niveau des plaques amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer (Grundke-Iqbal et al., 1986). Des expériences effectuées sur des modèles de souris invalidées pour des gènes autophagiques dans le SNC (par exemple *atg5<sup>fff</sup>: Nestin Cre*, *atg7<sup>fff</sup>: Nestin Cre* ou *fip200<sup>fff</sup>: Nestin Cre*) ont montré que l'absence du système autophagique peut conduire à une accumulation anormale de protéines comme observée dans les maladies neurodégénératives. Par ailleurs, le dysfonctionnement des mitochondries est également une des caractéristiques de ces maladies (Pinto et al., 2012) et, dans le cas de la maladie de Parkinson, des mutations dans des gènes impliqués dans la mitophagie (par exemple *pink1* et *park2*) contribuent à la pathogenèse de cette maladie (Houlden and Singleton, 2012).

Nous avons montré précédemment une localisation ponctiforme de la protéine GABARAPL1, correspondant partiellement à des vésicules autophagiques, dans les cellules neuronales. Nous avons également démontré que GABARAPL1 est un nouvel effecteur de l'autophagie et d'autres équipes ont décrit un rôle de cette protéine dans l'autophagie sélective des agrégats ubiquitinylés et des mitochondries endommagées. De plus, nous avons décrit que cette protéine est fortement exprimée dans les neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* et que son expression est augmentée dans le cerveau d'un patient atteint de la maladie de Parkinson.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à étudier le rôle cellulaire de GABARAPL1 dans des modèles neuronaux soumis à des stress mitochondriaux. Dans cette étude, nous avons créé deux lignées neuronales surexprimant de façon stable la protéine recombinante DsRed-GABARAPL1 : les cellules SH-SY5Y DsRed-GABARAPL1 et les cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1. Nous avons ensuite montré que bien que les cellules SK-N-BE(2)DsRed-GABARAPL1 réagissent normalement aux inducteurs et aux inhibiteurs de l'autophagie, elles présentent une réponse autophagique plus rapide vis à vis d'un stress mitochondrial induit par le composé CCCP. Plus important encore, la surexpression de GABARAPL1 semble protéger les cellules contre la mort cellulaire induite par le CCCP et GABARAPL1 est relocalisée à proximité de la protéine NIX après traitement avec le CCCP.

Le CCCP est un protonophore capable de transporter les protons à travers les bicouches lipidiques, conduisant au découplage de la phosphorylation oxydative et induisant la dépolarisation de la membrane mitochondriale. D'autre part, il a été démontré que la perte du potentiel membranaire mitochondrial conduit à la dégradation autophagique des

mitochondries (Kim et al., 2007). Ces résultats, et le fait que GABARAPL1 soit impliquée dans la dégradation autophagique, nous ont conduit à proposer l'hypothèse suivante : GABARAPL1 pourrait protéger les cellules neuronales contre le stress mitochondrial par l'intermédiaire d'une activation de la mitophagie induisant l'élimination spécifique des mitochondries endommagées par l'autophagie.

## 2.1 GABARAPL1 et mitophagie

### 2.1.1 La mitophagie dépendante de NIX

La première voie de la dégradation mitochondriale autophagique est la mitophagie dépendante de la protéine NIX. En effet, l'équipe d'Ivan Dikic a récemment démontré que NIX recrute préférentiellement GABARAPL1 au niveau des mitochondries endommagées dans les MEF durant la mitophagie induite par un traitement au CCCP (Novak *et al.*, 2010). Ils ont également montré qu'une mutation dans son domaine LIR, inhibant l'interaction entre NIX et les GABARAP, ralentit la dégradation des mitochondries dans les réticulocytes murins.

Nos résultats préliminaires obtenus au cours de ma thèse ont démontré une augmentation du marquage ponctiforme de DsRed-GABARAPL1 dans les cellules après traitement par le CCCP. Alors que cette protéine se trouve à proximité de la protéine GFP-NIX dans les cellules, on ne détecte que peu de co-localisation après traitement. Ceci est surprenant étant donné que la co-localisation entre GABARAPL1 et NIX a déjà été démontrée dans les mêmes conditions dans les cellules MEF *nix*<sup>-/-</sup> transfectées par des vecteurs codant les protéines EGFP-GABARAPL1 et FLAG-NIX (Novak *et al.*, 2010). Ces résultats pourraient s'expliquer par un problème au niveau de la stratégie expérimentale. En effet, pour pouvoir visualiser NIX durant notre étude, les cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 ont été transfectées par un vecteur codant la protéine de fusion GFP-NIX. Il est donc possible que la distribution cellulaire de cette protéine recombinante ne soit pas la même que celle de la protéine NIX endogène. Il sera donc nécessaire de répéter cette expérience sur la co-localisation entre DsRed-GABARAPL1 et la protéine NIX endogène en utilisant un anticorps capable de détecter la protéine endogène. De même, des expériences sur des cultures primaires neuronales pourront être envisagées afin d'étudier la co-localisation entre les deux protéines endogènes.

### 2.1.2 La mitophagie dépendante de PINK1/PARKIN

La dépolarisation de la membrane mitochondriale induite par le CCCP implique également une mitophagie dépendante de PINK1 et PARKIN. La voie PINK1/PARKIN est déclenchée lorsque PINK1 est stabilisée sur la membrane externe des mitochondries endommagées, pour faciliter le recrutement de la protéine cytosolique PARKIN (Narendra *et al.*, 2008; Matsuda *et al.*, 2010). PARKIN, une E3 ligase, peut alors induire la conjugaison de l'ubiquitine à plusieurs protéines membranaires mitochondriales et cibler les mitochondries vers la dégradation autophagique. Les chaînes d'ubiquitine sont ensuite reconnues par les protéines adaptatrices de l'autophagie sélective, telle que p62, pour faire le lien avec les protéines ATG8, comme GABARAPL1.

Le traitement des cellules SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1 avec le CCCP et le 6-OHDA conduit à la dégradation de la protéine p62. Ce résultat suggère que la protéine DsRed-GABARAPL1 pourrait cibler les mitochondries endommagées vers les lysosomes pour leur dégradation grâce à son interaction avec p62. Pour vérifier cette hypothèse, il sera intéressant d'étudier la co-localisation de ces deux protéines après traitement avec le CCCP dans notre modèle.

### 2.1.3 Le rôle de DsRed-GABARAPL1 dans la dégradation autophagique

Au cours de notre étude de la lignée SK-N-BE(2) DsRed-GABARAPL1, nous n'avons observé qu'une bande à 48 kDa après détection avec un anticorps anti-GABARAPL1 alors que cette protéine peut exister sous trois formes : la protéine DsRed-GABARAPL1, la forme clivée mature de la protéine (-I) ou la forme phospholipidée de la protéine (-II). Ces résultats pourraient s'expliquer par 1) une maturation complète de la forme -I en forme -II de la protéine après synthèse ; 2) une dégradation complète de la forme -II par autophagie ou ; 3) une mauvaise séparation des deux formes en SDS-PAGE. Pour identifier la forme que nous avons détectée en western-blotting, il faudra effectuer des expériences avec des inhibiteurs de la dégradation lysosomale telle que Baf A1 (pour faire apparaître la forme -II) suivies d'une séparation en gel SDS-PAGE dans des conditions optimales pour séparer ces deux protéines.

Alors qu'un rôle de GABARAPL1 au cours de la mitophagie semble probable selon la littérature et nos expériences, il reste à être confirmé. Pour vérifier que l'effet protecteur de la surexpression de DsRed-GABARAPL1 dans notre modèle est bien lié à son rôle dans la



dégradation autophagique, nous pourrions utiliser un deuxième modèle, disponible dans notre laboratoire, qui surexprime une forme mutée de la protéine GABARAPL1 : la protéine FLAG-GABARAPL1-G116A-6HIS. En effet, cette mutation a été décrite pour inhiber la conjugaison de cette protéine aux phospholipides et donc de son rôle au cours de l'autophagie.

## 2.2 Les inconvénients de nos modèles

### 2.2.1 La surexpression de DsRed-GABARAPL1

Le fait que la protéine GABARAPL1 ne semble pas être exprimée dans les lignées neuronales examinées, a nécessité sa surexpression afin de pouvoir étudier son rôle dans ces cellules. Nous avons choisi de surexprimer la protéine fluorescente DsRed-GABARAPL1 afin de pouvoir suivre sa localisation au cours des différents traitements. L'utilisation de la protéine DsRed présente aussi des obstacles techniques. En effet, cette protéine fluorescente est connue pour former des oligomères (Sacchetti et al., 2002) et pourrait donc avoir un effet sur la localisation de la protéine de fusion. Cependant, nous avons précédemment décrit la distribution diffuse et cytosolique de cette protéine de fusion dans une lignée cellulaire déficiente pour l'autophagie : les MEF *atg5*<sup>-/-</sup> (Chakrama *et al.*, 2010). Ceci confirme que la distribution ponctiforme visible dans notre modèle est une conséquence de la maturation et de la conjugaison aux vésicules autophagiques de la protéine DsRed-GABARAPL1.

### 2.2.2 Le CCCP

Alors que le CCCP est le composé chimique le plus utilisé pour induire la mitophagie, son utilisation présente certains inconvénients. Comme mentionné précédemment, le CCCP est un protonophore non-spécifique et par conséquent, il peut agir au niveau de plusieurs organites cellulaires. En effet, il a été démontré qu'un traitement par le FCCP de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , un autre découplant de la phosphorylation oxydative très similaire au CCCP, induit une perturbation du réseau des microtubules (Maro et al., 1982). Le CCCP peut aussi affecter l'acidification des lysosomes par l'induction de la formation de lésions au niveau de la membrane lysosomale, un événement qui se produit après la dépolarisation de la membrane mitochondriale (Giusti et al., 2009). Pour contourner ce problème, nous envisageons des expériences avec des traitements moins sévères ou qui visent plus spécifiquement les mitochondries tels que des traitements par la valinomycine, un ionophore du potassium, ou

l'antimycine A, un inhibiteur du complexe III. Ces deux composés ont aussi été décrits pour induire la mitophagie par recrutement de la protéine PARKIN (Seibler et al., 2011; Wang et al., 2011).

### III Perspectives

Les résultats de mon travail de thèse ont permis d'identifier un outil de détection spécifique de la protéine endogène GABARAPL1, d'étudier l'expression neuronale de cette protéine durant le développement et chez l'adulte dans le SNC et de montrer un effet protecteur de la protéine GABARAPL1 contre le stress mitochondrial induit par le CCCP. Compte tenu de ces résultats, il existe plusieurs axes d'études pour les futurs projets :

- la poursuite de l'étude de l'expression des différents membres de la famille ATG8 dans le SNC embryonnaire ;
- l'étude du rôle de GABARAPL1 dans la différenciation neuronale ;
- l'étude du lien entre l'expression de GABARAPL1 dans une population de neurones et leurs réponses électrophysiologiques à des stimuli ;
- la poursuite de l'étude du rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie spécifique dans des modèles de stress mitochondriaux *in vitro* ou des modèles de neurodégénérescence *in vivo*.

L'identification d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine GABARAPL1 nous permettra d'étudier la protéine endogène. La poursuite de l'étude sur l'expression des différents membres de la famille ATG8 dans le SNC nécessitera cependant l'identification d'un anticorps spécifique dirigé contre les autres membres de la sous-famille GABARAP, en particulier la protéine GABARAP. En effet, un tel outil est indispensable pour l'étude des distributions des deux protéines endogènes au cours du développement et dans des modèles de neurodégénérescence.

La création de souris invalidées pour le gène *gabarapl1* et de souris invalidées pour le gène *gabarapl1* spécifiquement au niveau du SNC sera aussi indispensable à l'étude du rôle de cette protéine dans les différentes voies énoncées dans cette discussion. En effet, il existe déjà des cellules souches embryonnaires *gabarapl1*<sup>-/-</sup> disponibles dans le commerce *via International Knockout Mouse Consortium* (clones : HEPD0570\_7\_C11 et HEPD0570\_7\_E09). Ensuite, il sera intéressant, de croiser la lignée *gabarapl1*<sup>-/-</sup> avec des souris invalidées pour *gabarap* (O'Sullivan *et al.*, 2005). Alors qu'aucun phénotype n'est observé dans le SNC chez

les souris invalidées pour le gène *gabarap*, l'expression importante de GABARAPL1 dans cet organe suggère que la déficience de GABARAPL1 seule ou des deux protéines, GABARAP et GABARAPL1, pourrait produire un effet important au niveau du cerveau.

Finalement, la caractérisation du rôle de GABARAPL1 dans l'autophagie sélective en réponse au stress mitochondrial semble importante pour nos futures études concernant les maladies neurodégénératives et la modulation de l'autophagie dans ces pathologies. En effet, nous pouvons postuler que la modulation de l'expression d'une protéine telle que GABARAPL1 dans des modèles de neurodégénérescence pourrait avoir un effet sur la dégradation d'organites et de protéines endommagés et donc aider à la protection des neurones contre des stress cellulaires. Ces données pourraient avoir des implications pour le traitement des maladies neurodégénératives *via* la modulation de l'autophagie.

# **BIBLIOGRAPHIE**

---



- Abeliovich, H., W. A. Dunn, Jr., J. Kim and D. J. Klionsky (2000) Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol* **151**(5):1025-1034.
- Accili, D. and K. C. Arden (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117**(4):421-426.
- Agarraberes, F. A. and J. F. Dice (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* **114**(Pt 13):2491-2499.
- Agarraberes, F. A., S. R. Terlecky and J. F. Dice (1997) An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol* **137**(4):825-834.
- Al Rawi, S., S. Louvet-Vallee, A. Djeddi, M. Sachse, E. Culetto, C. Hajjar, L. Boyd, R. Legouis and V. Galy (2011) Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* **334**(6059):1144-1147.
- Alam, J., D. Deharo, K. M. Redding, R. N. Re and J. L. Cook (2010) C-terminal processing of GABARAP is not required for trafficking of the angiotensin II type 1A receptor. *Regul Pept* **159**(1-3):78-86.
- Alemu, E. A., T. Lamark, K. M. Torgersen, A. B. Birgisdottir, K. Bowitz Larsen, A. Jain, H. Olsvik, A. Overvatn, V. Kirkin and T. Johansen (2012) ATG8 Family Proteins Act as Scaffolds for Assembly of the ULK Complex: Sequence Requirements for LC3-Interacting Region (LIR) Motifs. *J Biol Chem*.
- Alirezaei, M., C. C. Kemball, C. T. Flynn, M. R. Wood, J. L. Whitton and W. B. Kiosses (2010) Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy* **6**(6):702-710.
- Anggono, V. and R. L. Huganir (2012) Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* **22**(3):461-469.
- Anglade, P., S. Vyas, F. Javoy-Agid, M. T. Herrero, P. P. Michel, J. Marquez, A. Mouatt-Prigent, M. Ruberg, E. C. Hirsch and Y. Agid (1997) Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* **12**(1):25-31.
- Aplin, A., T. Jasionowski, D. L. Tuttle, S. E. Lenk and W. A. Dunn, Jr. (1992) Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J Cell Physiol* **152**(3):458-466.
- Ashford, T. P. and K. R. Porter (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol* **12**:198-202.
- Atlashkin, V., V. Kreykenbohm, E. L. Eskelinen, D. Wenzel, A. Fayyazi and G. Fischer von Mollard (2003) Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8. *Mol Cell Biol* **23**(15):5198-5207.
- Axe, E. L., S. A. Walker, M. Manifava, P. Chandra, H. L. Roderick, A. Habermann, G. Griffiths and N. T. Ktistakis (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**(4):685-701.

- Backer, J. M. and J. F. Dice (1986) Covalent linkage of ribonuclease S-peptide to microinjected proteins causes their intracellular degradation to be enhanced during serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(16):5830-5834.
- Bandyopadhyay, U., S. Kaushik, L. Varticovski and A. M. Cuervo (2008) The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* **28**(18):5747-5763.
- Barthel, A., D. Schmoll and T. G. Unterman (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **16**(4):183-189.
- Bedford, L., D. Hay, A. Devoy, S. Paine, D. G. Powe, R. Seth, T. Gray, I. Topham, K. Fone, N. Rezvani, M. Mee, T. Soane, R. Layfield, P. W. Sheppard, T. Ebendal, D. Usoskin, J. Lowe and R. J. Mayer (2008) Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci* **28**(33):8189-8198.
- Behrends, C., M. E. Sowa, S. P. Gygi and J. W. Harper (2010) Network organization of the human autophagy system. *Nature* **466**(7302):68-76.
- Bensaad, K., E. C. Cheung and K. H. Vousden (2009) Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J* **28**(19):3015-3026.
- Bensaad, K., A. Tsuruta, M. A. Selak, M. N. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb and K. H. Vousden (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* **126**(1):107-120.
- Berthier, A. (2008). Développement d'outils "biocapteur/modèle cellulaire" pour l'identification de ligands et l'étude des interactions ADN/protéine et protéines/protéines. *Sciences de la Vie et de la Santé*. Besançon, Université de Franche-Comté: 203.
- Berthier, A., S. Seguin, A. J. Sasco, J. Y. Bobin, G. De Laroche, J. Datchary, S. Saez, C. Rodriguez-Lafrasse, F. Tolle, A. Fraichard, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, R. Delage-Mourroux and F. Descotes (2010) High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* **102**(6):1024-1031.
- Berwick, D. C. and K. Harvey (2012) The importance of Wnt signalling for neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans* **40**(5):1123-1128.
- Betin, V. M. and J. D. Lane (2009) Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* **122**(Pt 14):2554-2566.
- Betin, V. M., T. D. MacVicar, S. F. Parsons, D. J. Anstee and J. D. Lane (2012) A cryptic mitochondrial targeting motif in Atg4D links caspase cleavage with mitochondrial import and oxidative stress. *Autophagy* **8**(4):664-676.
- Bilson, H. A., D. L. Mitchell and B. Ashby (2004) Human prostaglandin EP3 receptor isoforms show different agonist-induced internalization patterns. *FEBS Lett* **572**(1-3):271-275.
- Bjorkoy, G., T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark and T. Johansen (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**(4):603-614.

- Boland, B., A. Kumar, S. Lee, F. M. Platt, J. Wegiel, W. H. Yu and R. A. Nixon (2008) Autophagy Induction and Autophagosome Clearance in Neurons: Relationship to Autophagic Pathology in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* **28**(27):6926-6937.
- Bourque, M., D. E. Dluzen and T. Di Paolo (2009) Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Frontiers in neuroendocrinology* **30**(2):142-157.
- Broadwell, R. D. and A. M. Cataldo (1984) The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals. *J Comp Neurol* **230**(2):231-248.
- Cai, Q., H. M. Zakaria, A. Simone and Z. H. Sheng (2012) Spatial parkin translocation and degradation of damaged mitochondria via mitophagy in live cortical neurons. *Curr Biol* **22**(6):545-552.
- Calabresi, P., D. Centonze and G. Bernardi (2000) Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. *Trends Neurosci* **23**(10 Suppl):S57-63.
- Cartharius, K., K. Frech, K. Grote, B. Klocke, M. Haltmeier, A. Klingenhoff, M. Frisch, M. Bayerlein and T. Werner (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**(13):2933-2942.
- Castagnetta, L., O. M. Granata, L. Cocciadiferro, A. Saetta, L. Polito, G. Bronte, S. Rizzo, I. Campisi, B. Agostara and G. Carruba (2004) Sex steroids, carcinogenesis, and cancer progression. *Ann N Y Acad Sci* **1028**:233-246.
- Cataldo, A. M., D. J. Hamilton, J. L. Barnett, P. A. Paskevich and R. A. Nixon (1996) Properties of the endosomal-lysosomal system in the human central nervous system: disturbances mark most neurons in populations at risk to degenerate in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**(1):186-199.
- Cavey, J. R., S. H. Ralston, L. J. Hocking, P. W. Sheppard, B. Ciani, M. S. Searle and R. Layfield (2005) Loss of ubiquitin-binding associated with Paget's disease of bone p62 (SQSTM1) mutations. *J Bone Miner Res* **20**(4):619-624.
- Cemma, M., P. K. Kim and J. H. Brumell (2011) The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway. *Autophagy* **7**(3):341-345.
- Chakrama, F. Z. (2011). La protéine GEC1/GABARAPL1: rôle au cours de l'autophagie et expression dans les cellules cancéreuses. *Sciences de la Vie et de la Santé*. Besançon, Université de Franche-Comté: 274.
- Chakrama, F. Z., S. Seguin-Py, J. N. Le Grand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot and M. Boyer-Guittaut (2010) GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* **6**(4):495-505.
- Chan, E. Y., S. Kir and S. A. Tooze (2007) siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* **282**(35):25464-25474.
- Chan, E. Y., A. Longatti, N. C. McKnight and S. A. Tooze (2009) Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* **29**(1):157-171.



- Chen, C., J. G. Li, Y. Chen, P. Huang, Y. Wang and L. Y. Liu-Chen (2006) GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* **281**(12):7983-7993.
- Chen, C., Y. Wang, P. Huang and L. Y. Liu-Chen (2011) Effects of C-terminal modifications of GEC1 protein and gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor-associated protein (GABARAP), two microtubule-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem* **286**(17):15106-15115.
- Chen, D., X. Chen, M. Li, H. Zhang, W. X. Ding and X. M. Yin (2013) CCCP-Induced LC3 lipidation depends on Atg9 whereas FIP200/Atg13 and Beclin 1/Atg14 are dispensable. *Biochem Biophys Res Commun* **432**(2):226-230.
- Chen, Y., C. Chen, E. Kotsikorou, D. L. Lynch, P. H. Reggio and L. Y. Liu-Chen (2009) GEC1-kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect. *J Biol Chem* **284**(3):1673-1685.
- Chen, Y., E. McMillan-Ward, J. Kong, S. J. Israels and S. B. Gibson (2007) Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci* **120**(Pt 23):4155-4166.
- Chen, Y., E. McMillan-Ward, J. Kong, S. J. Israels and S. B. Gibson (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* **15**(1):171-182.
- Chen, Z. W., C. S. Chang, T. A. Leil and R. W. Olsen (2007) C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci* **27**(25):6655-6663.
- Chiacchiera, F., A. Matrone, E. Ferrari, G. Ingravallo, G. Lo Sasso, S. Murzilli, M. Petruzzelli, L. Salvatore, A. Moschetta and C. Simone (2009) p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription. *Cell Death Differ* **16**(9):1203-1214.
- Chiacchiera, F. and C. Simone (2009) Inhibition of p38alpha unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. *Autophagy* **5**(7):1030-1033.
- Chiang, H. L. and J. F. Dice (1988) Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J Biol Chem* **263**(14):6797-6805.
- Chiang, H. L., S. R. Terlecky, C. P. Plant and J. F. Dice (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* **246**(4928):382-385.
- Christensen, A., G. E. Bentley, R. Cabrera, H. H. Ortega, N. Perfito, T. J. Wu and P. Micevych (2012) Hormonal regulation of female reproduction. *Horm Metab Res* **44**(8):587-591.
- Chu, Z., J. Andrade, M. A. Shupnik and S. M. Moenter (2009) Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *J Neurosci* **29**(17):5616-5627.
- Ciechanover, A. and P. Brundin (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* **40**(2):427-446.

- Ciechanowska, M., M. Lapot, T. Malewski, K. Mateusiak, T. Misztal and F. Przekop (2009) Effects of GABA(A) receptor modulation on the expression of GnRH gene and GnRH receptor (GnRH-R) gene in the hypothalamus and GnRH-R gene in the anterior pituitary gland of follicular-phase ewes. *Anim Reprod Sci* **111**(2-4):235-248.
- Clark, K. L., E. D. Halay, E. Lai and S. K. Burley (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**(6436):412-420.
- Clark, S. L., Jr. (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* **3**(3):349-362.
- Clarkson, J., X. d'Anglemont de Tassigny, A. S. Moreno, W. H. Colledge and A. E. Herbison (2008) Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* **28**(35):8691-8697.
- Clausen, T. H., T. Lamark, P. Isakson, K. Finley, K. B. Larsen, A. Brech, A. Overvatn, H. Stenmark, G. Bjorkoy, A. Simonsen and T. Johansen (2010) p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* **6**(3):330-344.
- Colecchia, D., A. Strambi, S. Sanzone, C. Iavarone, M. Rossi, C. Dall'Armi, F. Piccioni, A. Verrotti di Pianella and M. Chiariello (2012) MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy* **8**(12):1724-1740.
- Cook, J. L., R. N. Re, D. L. deHaro, J. M. Abadie, M. Peters and J. Alam (2008) The trafficking protein GABARAP binds to and enhances plasma membrane expression and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* **102**(12):1539-1547.
- Cook, W. J., L. C. Jeffrey, M. Carson, Z. Chen and C. M. Pickart (1992) Structure of a diubiquitin conjugate and a model for interaction with ubiquitin conjugating enzyme (E2). *J Biol Chem* **267**(23):16467-16471.
- Coyle, J. E., S. Qamar, K. R. Rajashankar and D. B. Nikolov (2002) Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding. *Neuron* **33**(1):63-74.
- Crighton, D., S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P. R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook and K. M. Ryan (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**(1):121-134.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**(5274):501-503.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (2000) Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **275**(40):31505-31513.
- Cuervo, A. M. and J. F. Dice (2000) Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J Cell Sci* **113 Pt 24**:4441-4450.
- Cuervo, A. M., H. Hildebrand, E. M. Bomhard and J. F. Dice (1999) Direct lysosomal uptake of alpha 2-microglobulin contributes to chemically induced nephropathy. *Kidney Int* **55**(2):529-545.

- Cuervo, A. M., E. Knecht, S. R. Terlecky and J. F. Dice (1995) Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol* **269**(5 Pt 1):C1200-1208.
- Cuervo, A. M., L. Stefanis, R. Fredenburg, P. T. Lansbury and D. Sulzer (2004) Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* **305**(5688):1292-1295.
- Dalton, W. S. (2004) The proteasome. *Semin Oncol* **31**(6 Suppl 16):3-9; discussion 33.
- De Duve, C. and R. Wattiaux (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**:435-492.
- de Forges, H., A. Bouissou and F. Perez (2012) Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* **44**(2):266-274.
- De Palma, C., F. Morisi, S. Cheli, S. Pambianco, V. Cappello, M. Vezzoli, P. Rovere-Querini, M. Moggio, M. Ripolone, M. Francolini, M. Sandri and E. Clementi (2012) Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis* **3**:e418.
- de Reuck AVS, C. M. (1963). Ciba Foundation Symposium on Lysosomes. Ciba Foundation Symposium on Lysosomes, London, J.A. Churchill Ltd.
- De Vos, K. J., A. J. Grierson, S. Ackerley and C. C. Miller (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* **31**:151-173.
- Deosaran, E., K. B. Larsen, R. Hua, G. Sargent, Y. Wang, S. Kim, T. Lamark, M. Jauregui, K. Law, J. Lippincott-Schwartz, A. Brech, T. Johansen and P. K. Kim (2012) NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J Cell Sci*.
- Deter, R. L. and C. De Duve (1967) Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* **33**(2):437-449.
- Dice, J. F. (1982) Altered degradation of proteins microinjected into senescent human fibroblasts. *J Biol Chem* **257**(24):14624-14627.
- Dice, J. F., C. D. Walker, B. Byrne and A. Cardiel (1978) General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(5):2093-2097.
- DiFiglia, M., E. Sapp, K. O. Chase, S. W. Davies, G. P. Bates, J. P. Vonsattel and N. Aronin (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**(5334):1990-1993.
- Ding, Q., E. Dimayuga, S. Martin, A. J. Bruce-Keller, V. Nukala, A. M. Cuervo and J. N. Keller (2003) Characterization of chronic low-level proteasome inhibition on neural homeostasis. *J Neurochem* **86**(2):489-497.
- Ding, W. X., H. M. Ni, M. Li, Y. Liao, X. Chen, D. B. Stolz, G. W. Dorn, 2nd and X. M. Yin (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* **285**(36):27879-27890.
- Dixon, J. S. (1967) "Phagocytic" lysosomes in chromatolytic neurones. *Nature* **215**(5101):657-658.

- Dobrowolny, G., M. Aucello, E. Rizzuto, S. Beccafico, C. Mammucari, S. Boncompagni, S. Belia, F. Wannenes, C. Nicoletti, Z. Del Prete, N. Rosenthal, M. Molinaro, F. Protasi, G. Fano, M. Sandri and A. Musaro (2008) Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* **8**(5):425-436.
- Du, L., R. W. Hickey, H. Bayir, S. C. Watkins, V. A. Tyurin, F. Guo, P. M. Kochanek, L. W. Jenkins, J. Ren, G. Gibson, C. T. Chu, V. E. Kagan and R. S. Clark (2009) Starving neurons show sex difference in autophagy. *J Biol Chem* **284**(4):2383-2396.
- Du, Y., D. Yang, L. Li, G. Luo, T. Li, X. Fan, Q. Wang, X. Zhang, Y. Wang and W. Le (2009) An insight into the mechanistic role of p53-mediated autophagy induction in response to proteasomal inhibition-induced neurotoxicity. *Autophagy* **5**(5):663-675.
- Dykstra, L. A., D. E. Gmerek, G. Winger and J. H. Woods (1987) Kappa opioids in rhesus monkeys. II. Analysis of the antagonistic actions of quadazocine and beta-funaltrexamine. *J Pharmacol Exp Ther* **242**(2):421-427.
- Elmore, S. P., T. Qian, S. F. Grissom and J. J. Lemasters (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J* **15**(12):2286-2287.
- Eskelinen, E. L., C. K. Schmidt, S. Neu, M. Willenborg, G. Fuertes, N. Salvador, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, J. Heeren, K. von Figura, E. Knecht and P. Saftig (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* **15**(7):3132-3145.
- Essrich, C., M. Lorez, J. A. Benson, J. M. Fritschy and B. Luscher (1998) Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**(7):563-571.
- Fader, C., D. Sanchez, M. Furlan and M. Colombo (2008) Induction of Autophagy Promotes Fusion of Multivesicular Bodies with Autophagic Vacuoles in K562 Cells. *Traffic* **9**(2):230-250.
- Fader, C. M., D. G. Sanchez, M. B. Mestre and M. I. Colombo (2009) TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta* **1793**(12):1901-1916.
- Filimonenko, M., P. Isakson, K. D. Finley, M. Anderson, H. Jeong, T. J. Melia, B. J. Bartlett, K. M. Myers, H. C. Birkeland, T. Lamark, D. Krainc, A. Brech, H. Stenmark, A. Simonsen and A. Yamamoto (2010) The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol Cell* **38**(2):265-279.
- Filimonenko, M., S. Stuffers, C. Raiborg, A. Yamamoto, L. Malerod, E. M. Fisher, A. Isaacs, A. Brech, H. Stenmark and A. Simonsen (2007) Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol* **179**(3):485-500.
- Fimia, G. M., A. Stoykova, A. Romagnoli, L. Giunta, S. Di Bartolomeo, R. Nardacci, M. Corazzari, C. Fuoco, A. Ucar, P. Schwartz, P. Gruss, M. Piacentini, K. Chowdhury and F. Cecconi (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**(7148):1121-1125.

- Finkel, T. (2003) Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* **15**(2):247-254.
- Finlay, B. L. and R. B. Darlington (1995) Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* **268**(5217):1578-1584.
- Finn, P. F. and J. F. Dice (2005) Ketone bodies stimulate chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* **280**(27):25864-25870.
- Friedman, L. G., M. L. Lachenmayer, J. Wang, L. He, S. M. Poulouse, M. Komatsu, G. R. Holstein and Z. Yue (2012) Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of alpha-synuclein and LRRK2 in the brain. *J Neurosci* **32**(22):7585-7593.
- Frith, M. C., U. Hansen and Z. Weng (2001) Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* **17**(10):878-889.
- Fujita, N., T. Itoh, H. Omori, M. Fukuda, T. Noda and T. Yoshimori (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* **19**(5):2092-2100.
- Funderburk, S. F., Q. J. Wang and Z. Yue (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol* **20**(6):355-362.
- Furuyama, T., T. Nakazawa, I. Nakano and N. Mori (2000) Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* **349**(Pt 2):629-634.
- Gachon, F., E. Nagoshi, S. A. Brown, J. Ripperger and U. Schibler (2004) The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* **113**(3):103-112.
- Ganley, I. G., H. Lam du, J. Wang, X. Ding, S. Chen and X. Jiang (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* **284**(18):12297-12305.
- Gao, W., J. H. Kang, Y. Liao, W. X. Ding, A. A. Gambotto, S. C. Watkins, Y. J. Liu, D. B. Stolz and X. M. Yin (2010) Biochemical isolation and characterization of the tubulovesicular LC3-positive autophagosomal compartment. *J Biol Chem* **285**(2):1371-1383.
- Geeraert, C., A. Ratier, S. G. Pfisterer, D. Perdiz, I. Cantaloube, A. Rouault, S. Pattingre, T. Proikas-Cezanne, P. Codogno and C. Pous (2010) Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation. *J Biol Chem* **285**(31):24184-24194.
- Gegg, M. E., J. M. Cooper, K. Y. Chau, M. Rojo, A. H. Schapira and J. W. Taanman (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* **19**(24):4861-4870.
- Geisler, S., K. M. Holmstrom, D. Skujat, F. C. Fiesel, O. C. Rothfuss, P. J. Kahle and W. Springer (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**(2):119-131.
- Gekakis, N., D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi and C. J. Weitz (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**(5369):1564-1569.

- Geng, J., M. Baba, U. Nair and D. J. Klionsky (2008) Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **182**(1):129-140.
- Geng, J. and D. J. Klionsky (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**(9):859-864.
- Giusti, C., M. F. Luciani, G. Klein, L. Aubry, E. Tresse, A. Kosta and P. Golstein (2009) Necrotic cell death: From reversible mitochondrial uncoupling to irreversible lysosomal permeabilization. *Exp Cell Res* **315**(1):26-38.
- Gong, R., C. S. Park, N. R. Abbassi and S. J. Tang (2006) Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem* **281**(27):18802-18815.
- Gordon-Weeks, P. R. and I. Fischer (2000) MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc Res Tech* **48**(2):63-74.
- Goto, H., M. Terunuma, T. Kanematsu, Y. Misumi, S. J. Moss and M. Hirata (2005) Direct interaction of N-ethylmaleimide-sensitive factor with GABA(A) receptor beta subunits. *Mol Cell Neurosci* **30**(2):197-206.
- Greer, E. L. and A. Brunet (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* **24**(50):7410-7425.
- Griswold, A. J., D. Ma, H. N. Cukier, L. D. Nations, M. A. Schmidt, R. H. Chung, J. M. Jaworski, D. Salyakina, I. Konidari, P. L. Whitehead, H. H. Wright, R. K. Abramson, S. M. Williams, R. Menon, E. R. Martin, J. L. Haines, J. R. Gilbert, M. L. Cuccaro and M. A. Pericak-Vance (2012) Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet.*
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y. C. Tung, M. S. Zaidi and H. M. Wisniewski (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* **261**(13):6084-6089.
- Gutierrez, M. G., D. B. Munafò, W. Beron and M. I. Colombo (2004) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* **117**(Pt 13):2687-2697.
- Hailey, D. W., A. S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P. K. Kim and J. Lippincott-Schwartz (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**(4):656-667.
- Hamamichi, S., R. N. Rivas, A. L. Knight, S. Cao, K. A. Caldwell and G. A. Caldwell (2008) Hypothesis-based RNAi screening identifies neuroprotective genes in a Parkinson's disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(2):728-733.
- Hanada, T., N. N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, Y. Fujioka, T. Takao, F. Inagaki and Y. Ohsumi (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* **282**(52):37298-37302.
- Hanson, P. I., R. Roth, H. Morisaki, R. Jahn and J. E. Heuser (1997) Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* **90**(3):523-535.

- Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano and N. Mizushima (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**(7095):885-889.
- Hara, T., A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J. L. Guan and N. Mizushima (2008) FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* **181**(3):497-510.
- Harkonen, P. L. and S. I. Makela (2004) Role of estrogens in development of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **92**(4):297-305.
- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, T. Noda, A. Yamaguchi, T. Yoshimori and A. Yamamoto (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* **11**(12):1433-1437.
- He, C., M. Baba, Y. Cao and D. J. Klionsky (2008) Self-interaction is critical for Atg9 transport and function at the phagophore assembly site during autophagy. *Mol Biol Cell* **19**(12):5506-5516.
- He, C. and B. Levine (2010) The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* **22**(2):140-149.
- He, C., J. R. Sumpter and B. Levine (2012) Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. *Autophagy* **8**(10):1548-1551.
- Hemelaar, J., V. S. Lelyveld, B. M. Kessler and H. L. Ploegh (2003) A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem* **278**(51):51841-51850.
- Herbison, A. E. and V. S. Fenelon (1995) Estrogen regulation of GABAA receptor subunit mRNA expression in preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain. *J Neurosci* **15**(3 Pt 2):2328-2337.
- Hernandez, D., C. A. Torres, W. Setlik, C. Cebrian, E. V. Mosharov, G. Tang, H. C. Cheng, N. Kholodilov, O. Yarygina, R. E. Burke, M. Gershon and D. Sulzer (2012) Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron* **74**(2):277-284.
- Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. L. Guan, N. Oshiro and N. Mizushima (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **20**(7):1981-1991.
- Hosokawa, N., T. Sasaki, S. Iemura, T. Natsume, T. Hara and N. Mizushima (2009) Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* **5**(7):973-979.
- Houlden, H. and A. B. Singleton (2012) The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* **124**(3):325-338.
- Hoyvik, H., P. B. Gordon, T. O. Berg, P. E. Stromhaug and P. O. Seglen (1991) Inhibition of autophagic-lysosomal delivery and autophagic lactolysis by asparagine. *J Cell Biol* **113**(6):1305-1312.
- Hrabovszky, E., I. Kallo, N. Szlavik, E. Keller, I. Merchenthaler and Z. Liposits (2007) Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(7):2827-2830.

- Hrabovszky, E., A. Steinhauser, K. Barabas, P. J. Shughrue, S. L. Petersen, I. Merchenthaler and Z. Liposits (2001) Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* **142**(7):3261-3264.
- Huang, W. P., S. V. Scott, J. Kim and D. J. Klionsky (2000) The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *J Biol Chem* **275**(8):5845-5851.
- Itakura, E., C. Kishi, K. Inoue and N. Mizushima (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* **19**(12):5360-5372.
- Itoh, T., N. Fujita, E. Kanno, A. Yamamoto, T. Yoshimori and M. Fukuda (2008) Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**(7):2916-2925.
- Itoh, T., E. Kanno, T. Uemura, S. Waguri and M. Fukuda (2011) OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J Cell Biol* **192**(5):839-853.
- Iwata, A., B. E. Riley, J. A. Johnston and R. R. Kopito (2005) HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* **280**(48):40282-40292.
- Jacobs, F. M., L. P. van der Heide, P. J. Wijchers, J. P. Burbach, M. F. Hoekman and M. P. Smidt (2003) FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* **278**(38):35959-35967.
- Jaeger, P. A. and T. Wyss-Coray (2009) All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener* **4**:16.
- Jagadeesh, G. (1998) Angiotensin II receptors-antagonists, molecular biology, and signal transduction. *Indian J Exp Biol* **36**(12):1171-1194.
- Jager, S., C. Bucci, I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, P. Saftig and E. L. Eskelinen (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**(Pt 20):4837-4848.
- Jahreiss, L., F. M. Menzies and D. C. Rubinsztein (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**(4):574-587.
- Jamart, C., N. Benoit, J. M. Raymackers, H. J. Kim, C. K. Kim and M. Francaux (2011) Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise. *Eur J Appl Physiol*.
- Jellinger, K. A. (2010) Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* **14**(3):457-487.
- Jiang, S., B. Heller, V. S. Tagliabracci, L. Zhai, J. M. Irimia, A. A. Depaoli-Roach, C. D. Wells, A. V. Skurat and P. J. Roach (2010) Starch binding domain containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem*.
- Jin, X., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. de Vries and S. M. Reppert (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **96**(1):57-68.



- Jones, C., R. E. Hammer, W. P. Li, J. C. Cohen, H. H. Hobbs and J. Herz (2003) Normal sorting but defective endocytosis of the low density lipoprotein receptor in mice with autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Biol Chem* **278**(31):29024-29030.
- Jung, C. H., C. B. Jun, S. H. Ro, Y. M. Kim, N. M. Otto, J. Cao, M. Kundu and D. H. Kim (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* **20**(7):1992-2003.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**(21):5720-5728.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, A. Yamamoto, S. Oshitani-Okamoto, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**(Pt 13):2805-2812.
- Kabuta, T., Y. Suzuki and K. Wada (2006) Degradation of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant Cu,Zn-superoxide dismutase proteins by macroautophagy and the proteasome. *J Biol Chem* **281**(41):30524-30533.
- Kaestner, K. H., W. Knochel and D. E. Martinez (2000) Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14**(2):142-146.
- Kaiser, S. E., K. Mao, A. M. Taherbhoy, S. Yu, J. L. Olszewski, D. M. Duda, I. Kurinov, A. Deng, T. D. Fenn, D. J. Klionsky and B. A. Schulman (2012) Noncanonical E2 recruitment by the autophagy E1 revealed by Atg7-Atg3 and Atg7-Atg10 structures. *Nat Struct Mol Biol*.
- Kassiotis, C., K. Ballal, K. Wellnitz, D. Vela, M. Gong, R. Salazar, O. H. Frazier and H. Taegtmeyer (2009) Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* **120**(11 Suppl):S191-197.
- Kaushik, N., D. Fear, S. C. Richards, C. R. McDermott, E. F. Nuwaysir, P. Kellam, T. J. Harrison, R. J. Wilkinson, D. A. Tyrrell, S. T. Holgate and J. R. Kerr (2005) Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* **58**(8):826-832.
- Kaushik, S., J. A. Rodriguez-Navarro, E. Arias, R. Kiffin, S. Sahu, G. J. Schwartz, A. M. Cuervo and R. Singh (2011) Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab* **14**(2):173-183.
- Kegel, K. B., M. Kim, E. Sapp, C. McIntyre, J. G. Castano, N. Aronin and M. DiFiglia (2000) Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, and autophagy. *J Neurosci* **20**(19):7268-7278.
- Kiffin, R., C. Christian, E. Knecht and A. M. Cuervo (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* **15**(11):4829-4840.
- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez and J. J. Lemasters (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**(2):245-253.
- Kim, J., W. P. Huang, P. E. Stromhaug and D. J. Klionsky (2002) Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J Biol Chem* **277**(1):763-773.

- Kim, P. K., D. W. Hailey, R. T. Mullen and J. Lippincott-Schwartz (2008) Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(52):20567-20574.
- Kimura, S., T. Noda and T. Yoshimori (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**(1):109-122.
- Kirkin, V., T. Lamark, Y. S. Sou, G. Bjorkoy, J. L. Nunn, J. A. Bruun, E. Shvets, D. G. McEwan, T. H. Clausen, P. Wild, I. Bilusic, J. P. Theurillat, A. Overvatn, T. Ishii, Z. Elazar, M. Komatsu, I. Dikic and T. Johansen (2009) A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* **33**(4):505-516.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno and N. Shimizu (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**(6676):605-608.
- Klionsky, D. J. (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(11):931-937.
- Klionsky, D. J. (2008) Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* **4**(6):740-743.
- Klionsky, D. J., J. M. Cregg, W. A. Dunn, Jr., S. D. Emr, Y. Sakai, I. V. Sandoval, A. Sibirny, S. Subramani, M. Thumm, M. Veenhuis and Y. Ohsumi (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**(4):539-545.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**(5497):1717-1721.
- Knight, D., R. Harris, M. S. McAlister, J. P. Phelan, S. Geddes, S. J. Moss, P. C. Driscoll and N. H. Keep (2002) The X-ray crystal structure and putative ligand-derived peptide binding properties of gamma-aminobutyric acid receptor type A receptor-associated protein. *J Biol Chem* **277**(7):5556-5561.
- Koike, M., M. Shibata, S. Waguri, K. Yoshimura, I. Tanida, E. Kominami, T. Gotow, C. Peters, K. von Figura, N. Mizushima, P. Saftig and Y. Uchiyama (2005) Participation of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol* **167**(6):1713-1728.
- Komatsu, M., T. Ueno, S. Waguri, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2007) Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differ* **14**(5):887-894.
- Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**(7095):880-884.
- Komatsu, M., S. Waguri, M. Koike, Y. S. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami and K. Tanaka (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**(6):1149-1163.

- Komatsu, M., Q. J. Wang, G. R. Holstein, V. L. Friedrich, Jr., J. Iwata, E. Kominami, B. T. Chait, K. Tanaka and Z. Yue (2007) Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(36):14489-14494.
- Kon, M., R. Kiffin, H. Koga, J. Chapochnik, F. Macian, L. Varticovski and A. M. Cuervo (2011) Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci Transl Med* **3**(109):109ra117.
- Kraft, C., M. Kijanska, E. Kalie, E. Siergiejuk, S. S. Lee, G. Semplicio, I. Stoffel, A. Brezovich, M. Verma, I. Hansmann, G. Ammerer, K. Hofmann, S. Tooze and M. Peter (2012) Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J* **31**(18):3691-3703.
- Kroemer, G., G. Marino and B. Levine (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**(2):280-293.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings and S. M. Reppert (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**(2):193-205.
- Kusama, Y., K. Sato, N. Kimura, J. Mitamura, H. Ohdaira and K. Yoshida (2009) Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human autophagy-related genes. *Apoptosis* **14**(10):1165-1175.
- Kwon, K. Y., B. Viollet and O. J. Yoo (2011) CCCP induces autophagy in an AMPK-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **416**(3-4):343-348.
- Lange, S., F. Xiang, A. Yakovenko, A. Vihola, P. Hackman, E. Rostkova, J. Kristensen, B. Brandmeier, G. Franzen, B. Hedberg, L. G. Gunnarsson, S. M. Hughes, S. Marchand, T. Sejersen, I. Richard, L. Edstrom, E. Ehler, B. Udd and M. Gautel (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* **308**(5728):1599-1603.
- Law, P. Y., Y. H. Wong and H. H. Loh (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**:389-430.
- Le Grand, J. N., F. Z. Chakrama, S. Seguin-Py, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot and M. Boyer-Guittaut (2011) GABARAPL1 (GEC1): Original or copycat? *Autophagy* **7**(10):1098-1107.
- Lecker, S. H., R. T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S. R. Price, W. E. Mitch and A. L. Goldberg (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* **18**(1):39-51.
- Lee, J. A. (2012) Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival? *Exp Neurol* **21**(1):1-8.
- Lee, J. A., A. Beigneux, S. T. Ahmad, S. G. Young and F. B. Gao (2007) ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* **17**(18):1561-1567.
- Lee, J. Y., Y. Nagano, J. P. Taylor, K. L. Lim and T. P. Yao (2010) Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* **189**(4):671-679.

- Legan, S. J. and H. W. Tsai (2003) Oestrogen receptor-alpha and -beta immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone neurones after ovariectomy and chronic exposure to oestradiol. *J Neuroendocrinol* **15**(12):1164-1170.
- Leil, T. A., Z. W. Chen, C. S. Chang and R. W. Olsen (2004) GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein traffics GABA<sub>A</sub> receptors to the plasma membrane in neurons. *J Neurosci* **24**(50):11429-11438.
- Li, W. W., J. Li and J. K. Bao (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* **69**(7):1125-1136.
- Liang, C., P. Feng, B. Ku, I. Dotan, D. Canaani, B. H. Oh and J. U. Jung (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol* **8**(7):688-699.
- Liang, C., J. S. Lee, K. S. Inn, M. U. Gack, Q. Li, E. A. Roberts, I. Vergne, V. Deretic, P. Feng, C. Akazawa and J. U. Jung (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* **10**(7):776-787.
- Liang, C. C., C. Wang, X. Peng, B. Gan and J. L. Guan (2010) Neural-specific deletion of FIP200 leads to cerebellar degeneration caused by increased neuronal death and axon degeneration. *J Biol Chem* **285**(5):3499-3509.
- Liu, H. Y., J. Han, S. Y. Cao, T. Hong, D. Zhuo, J. Shi, Z. Liu and W. Cao (2009) Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* **284**(45):31484-31492.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe and M. N. Hall (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* **10**(3):457-468.
- Lubahn, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach and O. Smithies (1993) Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23):11162-11166.
- Ma, J. F., Y. Huang, S. D. Chen and G. Halliday (2010) Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* **36**(4):312-319.
- Maday, S., K. E. Wallace and E. L. Holzbaur (2012) Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol* **196**(4):407-417.
- Maggi, R., P. Limonta, D. Dondi, L. Martini and F. Piva (1989) Distribution of kappa opioid receptors in the brain of young and old male rats. *Life Sci* **45**(22):2085-2092.
- Malyala, A., M. J. Kelly and O. K. Ronnekleiv (2005) Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids* **70**(5-7):397-406.

- Malyala, A., P. Pattee, S. R. Nagalla, M. J. Kelly and O. K. Ronnekleiv (2004) Suppression subtractive hybridization and microarray identification of estrogen-regulated hypothalamic genes. *Neurochem Res* **29**(6):1189-1200.
- Mameza, M. G., J. M. Lockard, E. Zamora, M. Hillefors, Z. S. Lavina and B. B. Kaplan (2007) Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions. *Journal of neurochemistry* **103**(3):927-941.
- Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S. J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A. L. Goldberg, S. Schiaffino and M. Sandri (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**(6):458-471.
- Mann, S. S. and J. A. Hammarback (1996) Gene localization and developmental expression of light chain 3: a common subunit of microtubule-associated protein 1A(MAP1A) and MAP1B. *J Neurosci Res* **43**(5):535-544.
- Mansuy, V., W. Boireau, A. Fraichard, J. L. Schlick, M. Jouvenot and R. Delage-Mourroux (2004) GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **325**(2):639-648.
- Mansuy, V., S. Geller, J. P. Rey, C. Campagne, J. Boccard, P. Poulain, V. Prevot and F. P. Pralong (2011) Phenotypic and molecular characterization of proliferating and differentiated GnRH-expressing GnV-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* **332**(1-2):97-105.
- Mansuy, V., P. Y. Risold, M. Glauser, A. Fraichard and F. P. Pralong (2009) Expression of the GABAA receptor associated protein Gec1 is circadian and dependent upon the cellular clock machinery in GnRH secreting GnV-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* **307**(1-2):68-76.
- Mansuy-Schlick, V., R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot and W. Boireau (2006) Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements. *Biosens Bioelectron* **21**(9):1830-1837.
- Mansuy-Schlick, V., F. Tolle, R. Delage-Mourroux, A. Fraichard, P. Y. Risold and M. Jouvenot (2006) Specific distribution of gabarap, gec1/gabarap Like 1, gate16/gabarap Like 2, lc3 messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* **1073-1074**:83-87.
- Mardakheh, F. K., G. Auciello, T. R. Dafforn, J. Z. Rappoport and J. K. Heath (2010) Nbr1 is a novel inhibitor of ligand-mediated receptor tyrosine kinase degradation. *Mol Cell Biol* **30**(24):5672-5685.
- Mardakheh, F. K., M. Yekezare, L. M. Machesky and J. K. Heath (2009) Spred2 interaction with the late endosomal protein NBR1 down-regulates fibroblast growth factor receptor signaling. *J Cell Biol* **187**(2):265-277.
- Marino, G. and C. Lopez-Otin (2004) Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* **61**(12):1439-1454.
- Maro, B., M. C. Marty and M. Bornens (1982) In vivo and in vitro effects of the mitochondrial uncoupler FCCP on microtubules. *EMBO J* **1**(11):1347-1352.
- Martinez-Vicente, M., Z. Talloczy, S. Kaushik, A. C. Massey, J. Mazzulli, E. V. Mosharov, R. Hodara, R. Fredenburg, D. C. Wu, A. Follenzi, W. Dauer, S. Przedborski, H. Ischiropoulos, P. T. Lansbury, D. Sulzer and A. M. Cuervo (2008) Dopamine-

- modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* **118**(2):777-788.
- Matsuda, N., S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C. A. Gautier, Y. S. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori and K. Tanaka (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* **189**(2):211-221.
- Matsunaga, K., E. Morita, T. Saitoh, S. Akira, N. T. Ktistakis, T. Izumi, T. Noda and T. Yoshimori (2010) Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol* **190**(4):511-521.
- Matsunaga, K., T. Saitoh, K. Tabata, H. Omori, T. Satoh, N. Kurotori, I. Maejima, K. Shirahama-Noda, T. Ichimura, T. Isobe, S. Akira, T. Noda and T. Yoshimori (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**(4):385-396.
- Matsuura, A., M. Tsukada, Y. Wada and Y. Ohsumi (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**(2):245-250.
- Matthews, M. R. and G. Raisman (1972) A light and electron microscopic study of the cellular response to axonal injury in the superior cervical ganglion of the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **181**(62):43-79.
- McDonald, P. H., N. L. Cote, F. T. Lin, R. T. Premont, J. A. Pitcher and R. J. Lefkowitz (1999) Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J Biol Chem* **274**(16):10677-10680.
- McIntire, S. L., G. Garriga, J. White, D. Jacobson and H. R. Horvitz (1992) Genes necessary for directed axonal elongation or fasciculation in *C. elegans*. *Neuron* **8**(2):307-322.
- Mercer, C. A., A. Kaliappan and P. B. Dennis (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* **5**(5):649-662.
- Michels, G. and S. J. Moss (2007) GABAA receptors: properties and trafficking. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**(1):3-14.
- Mijaljica, D., M. Prescott and R. J. Devenish (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**(7):673-682.
- Mizokami, A., T. Kanematsu, H. Ishibashi, T. Yamaguchi, I. Tanida, K. Takenaka, K. I. Nakayama, K. Fukami, T. Takenawa, E. Kominami, S. J. Moss, T. Yamamoto, J. Nabekura and M. Hirata (2007) Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of gamma2 subunit-containing GABA(A) receptors to the cell surface. *J Neurosci* **27**(7):1692-1701.
- Mizushima, N. (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**:1535-1541.
- Mizushima, N., A. Kuma, Y. Kobayashi, A. Yamamoto, M. Matsubae, T. Takao, T. Natsume, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116**(Pt 9):1679-1688.

- Mizushima, N., T. Noda and Y. Ohsumi (1999) Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J* **18**(14):3888-3896.
- Mizushima, N., T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi and Y. Ohsumi (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**(6700):395-398.
- Mizushima, N., H. Sugita, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J Biol Chem* **273**(51):33889-33892.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiya, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* **152**(4):657-668.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**(3):1101-1111.
- Mizushima, N., T. Yoshimori and Y. Ohsumi (2002) Mouse Apg10 as an Apg12-conjugating enzyme: analysis by the conjugation-mediated yeast two-hybrid method. *FEBS Lett* **532**(3):450-454.
- Moenter, S. M. and Z. Chu (2012) Rapid nongenomic effects of oestradiol on gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* **24**(1):117-121.
- Morimoto, N., M. Nagai, Y. Ohta, K. Miyazaki, T. Kurata, M. Morimoto, T. Murakami, Y. Takehisa, Y. Ikeda, T. Kamiya and K. Abe (2007) Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res* **1167**:112-117.
- Mostowy, S., V. Sancho-Shimizu, M. A. Hamon, R. Simeone, R. Brosch, T. Johansen and P. Cossart (2011) p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *J Biol Chem* **286**(30):26987-26995.
- Mousavi, S. A., R. Kjekens, T. O. Berg, P. O. Seglen, T. Berg and A. Brech (2001) Effects of inhibitors of the vacuolar proton pump on hepatic heterophagy and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1510**(1-2):243-257.
- Nagaoka, U., K. Kim, N. R. Jana, H. Doi, M. Maruyama, K. Mitsui, F. Oyama and N. Nukina (2004) Increased expression of p62 in expanded polyglutamine-expressing cells and its association with polyglutamine inclusions. *J Neurochem* **91**(1):57-68.
- Nakamura, T., T. Hayashi, Y. Nasu-Nishimura, F. Sakaue, Y. Morishita, T. Okabe, S. Ohwada, K. Matsuura and T. Akiyama (2008) PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-cadherin/beta-catenin complex. *Genes Dev* **22**(9):1244-1256.
- Nakatogawa, H., Y. Ichimura and Y. Ohsumi (2007) Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* **130**(1):165-178.
- Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen and R. J. Youle (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**(5):795-803.

- Narendra, D. P., S. M. Jin, A. Tanaka, D. F. Suen, C. A. Gautier, J. Shen, M. R. Cookson and R. J. Youle (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* **8**(1):e1000298.
- Nemos, C., V. Mansuy, S. Vernier-Magnin, A. Fraichard, M. Jouvenot and R. Delage-Mourroux (2003) Expression of *gec1*/GABARAPL1 versus GABARAP mRNAs in human: predominance of *gec1*/GABARAPL1 in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* **119**(2):216-219.
- Ng, Y., A. Wolfe, H. J. Novaira and S. Radovick (2009) Estrogen regulation of gene expression in GnRH neurons. *Mol Cell Endocrinol* **303**(1-2):25-33.
- Nishiyama, J., E. Miura, N. Mizushima, M. Watanabe and M. Yuzaki (2007) Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy* **3**(6):591-596.
- Nixon, R. A., J. Wegiel, A. Kumar, W. H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo and A. M. Cuervo (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(2):113-122.
- Noda, N. N., Y. Ohsumi and F. Inagaki (2010) Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett* **584**(7):1379-1385.
- Noel, S. D., K. L. Keen, D. I. Baumann, E. J. Filardo and E. Terasawa (2009) Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *Mol Endocrinol* **23**(3):349-359.
- Novak, I., V. Kirkin, D. G. McEwan, J. Zhang, P. Wild, A. Rozenknop, V. Rogov, F. Lohr, D. Popovic, A. Occhipinti, A. S. Reichert, J. Terzic, V. Dotsch, P. A. Ney and I. Dikic (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* **11**(1):45-51.
- Novikoff, A. B. (1959) The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. *J Biophys Biochem Cytol* **6**(1):136-138.
- Novikoff, A. B. and E. Essner (1962) Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *J Cell Biol* **15**:140-146.
- Novikoff, P. M., A. B. Novikoff, N. Quintana and J. J. Hauw (1971) Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J Cell Biol* **50**(3):859-886.
- O'Malley, B. W. (2005) A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Mol Endocrinol* **19**(6):1402-1411.
- O'Sullivan, G. A., M. Kneussel, Z. Elazar and H. Betz (2005) GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* **22**(10):2644-2648.
- Obara, K., T. Sekito and Y. Ohsumi (2006) Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes--Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **17**(4):1527-1539.
- Odagiri, S., K. Tanji, F. Mori, A. Kakita, H. Takahashi and K. Wakabayashi (2012) Autophagic adapter protein NBR1 is localized in Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions and is involved in aggregate formation in alpha-synucleinopathy. *Acta Neuropathol* **124**(2):173-186.



- Ogawa, S., V. Eng, J. Taylor, D. B. Lubahn, K. S. Korach and D. W. Pfaff (1998) Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology* **139**(12):5070-5081.
- Ogura, K., C. Wicky, L. Magnenat, H. Tobler, I. Mori, F. Muller and Y. Ohshima (1994) *Caenorhabditis elegans* unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase. *Genes Dev* **8**(20):2389-2400.
- Ohsumi, Y. (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3):211-216.
- Okazaki, N., J. Yan, S. Yuasa, T. Ueno, E. Kominami, Y. Masuho, H. Koga and M. Muramatsu (2000) Interaction of the Unc-51-like kinase and microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation. *Brain Res Mol Brain Res* **85**(1-2):1-12.
- Pan, T., S. Kondo, W. Zhu, W. Xie, J. Jankovic and W. Le (2008) Neuroprotection of rapamycin in lactacystin-induced neurodegeneration via autophagy enhancement. *Neurobiol Dis* **32**(1):16-25.
- Pandey, U. B., Z. Nie, Y. Batlevi, B. A. McCray, G. P. Ritson, N. B. Nedelsky, S. L. Schwartz, N. A. DiProspero, M. A. Knight, O. Schuldiner, R. Padmanabhan, M. Hild, D. L. Berry, D. Garza, C. C. Hubbert, T. P. Yao, E. H. Baehrecke and J. P. Taylor (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* **447**(7146):859-863.
- Pankiv, S., E. A. Alemu, A. Brech, J. A. Bruun, T. Lamark, A. Overvatn, G. Bjorkoy and T. Johansen (2010) FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol* **188**(2):253-269.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy and T. Johansen (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**(33):24131-24145.
- Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X. H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M. D. Schneider and B. Levine (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* **122**(6):927-939.
- Paz, Y., Z. Elazar and D. Fass (2000) Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem* **275**(33):25445-25450.
- Pellerin, I., C. Vuillermoz, M. Jouvenot, C. Ordener, M. Royez and G. L. Adessi (1993) Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* **90**(2):R17-21.
- Peng, C., J. Ye, S. Yan, S. Kong, Y. Shen, C. Li, Q. Li, Y. Zheng, K. Deng, T. Xu and W. Tao (2012) Ablation of vacuole protein sorting 18 (Vps18) gene leads to neurodegeneration and impaired neuronal migration by disrupting multiple vesicle transport pathways to lysosomes. *J Biol Chem* **287**(39):32861-32873.
- Petersen, S. L., E. N. Ottem and C. D. Carpenter (2003) Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod* **69**(6):1771-1778.

- Pfeiffer, A., V. Brantl, A. Herz and H. M. Emrich (1986) Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. *Science* **233**(4765):774-776.
- Pickford, F., E. Masliah, M. Britschgi, K. Lucin, R. Narasimhan, P. A. Jaeger, S. Small, B. Spencer, E. Rockenstein, B. Levine and T. Wyss-Coray (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J Clin Invest* **118**(6):2190-2199.
- Pinto, M., A. M. Pickrell and C. T. Moraes (2012) Regional susceptibilities to mitochondrial dysfunctions in the CNS. *Biol Chem* **393**(4):275-281.
- Platet, N., A. M. Cathiard, M. Gleizes and M. Garcia (2004) Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* **51**(1):55-67.
- Polager, S., M. Ofir and D. Ginsberg (2008) E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* **27**(35):4860-4864.
- Preitner, N., F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht and U. Schibler (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**(2):251-260.
- Proikas-Cezanne, T. and P. Codogno (2011) Beclin 1 or not Beclin 1. *Autophagy* **7**(7):671-672.
- Raasi, S., R. Varadan, D. Fushman and C. M. Pickart (2005) Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains. *Nat Struct Mol Biol* **12**(8):708-714.
- Ramachandran, N., I. Munteanu, P. Wang, P. Aubourg, J. J. Rilstone, N. Israelian, T. Naranian, P. Paroutis, R. Guo, Z. P. Ren, I. Nishino, B. Chabrol, J. F. Pellissier, C. Minetti, B. Udd, M. Fardeau, C. S. Taylor, D. J. Mahuran, J. T. Kissel, H. Kalimo, N. Levy, M. F. Manolson, C. A. Ackerley and B. A. Minassian (2009) VMA21 deficiency causes an autophagic myopathy by compromising V-ATPase activity and lysosomal acidification. *Cell* **137**(2):235-246.
- Ramesh Babu, J., M. Lamar Seibenhener, J. Peng, A. L. Strom, R. Kemppainen, N. Cox, H. Zhu, M. C. Wooten, M. T. Diaz-Meco, J. Moscat and M. W. Wooten (2008) Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *J Neurochem* **106**(1):107-120.
- Ravikumar, B., R. Duden and D. C. Rubinsztein (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* **11**(9):1107-1117.
- Ravikumar, B., K. Moreau and D. C. Rubinsztein (2010) Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy* **6**(8):1184-1186.
- Rawal, N., O. Corti, P. Sacchetti, H. Ardilla-Osorio, B. Sehat, A. Brice and E. Arenas (2009) Parkin protects dopaminergic neurons from excessive Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **388**(3):473-478.
- Reggiori, F. (2006) 1. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol* **74**:1-30.

- Reggiori, F., K. A. Tucker, P. E. Stromhaug and D. J. Klionsky (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* **6**(1):79-90.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418**(6901):935-941.
- Rideout, H. J., I. Lang-Rollin and L. Stefanis (2004) Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12):2551-2562.
- Ripperger, J. A. and U. Schibler (2001) Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr Opin Cell Biol* **13**(3):357-362.
- Robinson, L. J., F. Aniento and J. Gruenberg (1997) NSF is required for transport from early to late endosomes. *J Cell Sci* **110** ( Pt 17):2079-2087.
- Rogoff, H. A. and T. F. Kowalik (2004) Life, death and E2F: linking proliferation control and DNA damage signaling via E2F1. *Cell Cycle* **3**(7):845-846.
- Romano, N., K. Lee, I. M. Abraham, C. L. Jasoni and A. E. Herbison (2008) Nonclassical estrogen modulation of presynaptic GABA terminals modulates calcium dynamics in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* **149**(11):5335-5344.
- Rosello, A., G. Warnes and U. C. Meier (2012) Cell death pathways and autophagy in the central nervous system and its involvement in neurodegeneration, immunity and central nervous system infection: to die or not to die--that is the question. *Clin Exp Immunol* **168**(1):52-57.
- Rothman, J. E. (1994) Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **29**:81-96.
- Rowland, A. M., J. E. Richmond, J. G. Olsen, D. H. Hall and B. A. Bamber (2006) Presynaptic terminals independently regulate synaptic clustering and autophagy of GABAA receptors in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* **26**(6):1711-1720.
- Roy, D., N. L. Angelini and D. D. Belsham (1999) Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* **140**(11):5045-5053.
- Rozenknop, A., V. V. Rogov, N. Y. Rogova, F. Lohr, P. Guntert, I. Dikic and V. Dotsch (2011) Characterization of the interaction of GABARAPL-1 with the LIR motif of NBR1. *J Mol Biol* **410**(3):477-487.
- Rual, J. F., K. Venkatesan, T. Hao, T. Hirozane-Kishikawa, A. Dricot, N. Li, G. F. Berriz, F. D. Gibbons, M. Dreze, N. Ayivi-Guedehoussou, N. Klitgord, C. Simon, M. Boxem, S. Milstein, J. Rosenberg, D. S. Goldberg, L. V. Zhang, S. L. Wong, G. Franklin, S. Li, J. S. Albalá, J. Lim, C. Fraughton, E. Llamas, S. Cevik, C. Bex, P. Lamesch, R. S. Sikorski, J. Vandenhaute, H. Y. Zoghbi, A. Smolyar, S. Bosak, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, M. E. Cusick, D. E. Hill, F. P. Roth and M. Vidal (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* **437**(7062):1173-1178.

- Rubinsztein, D. C., M. DiFiglia, N. Heintz, R. A. Nixon, Z. H. Qin, B. Ravikumar, L. Stefanis and A. Tolkovsky (2005) Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* **1**(1):11-22.
- Rue, L., G. Lopez-Soop, E. Gelpi, M. Martinez-Vicente, J. Alberch and E. Perez-Navarro (2013) Brain region- and age-dependent dysregulation of p62 and NBR1 in a mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.*
- Rusten, T. E., T. Vaccari, K. Lindmo, L. M. Rodahl, I. P. Nezis, C. Sem-Jacobsen, F. Wendler, J. P. Vincent, A. Brech, D. Bilder and H. Stenmark (2007) ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr Biol* **17**(20):1817-1825.
- Sacchetti, A., V. Subramaniam, T. M. Jovin and S. Alberti (2002) Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Lett* **525**(1-3):13-19.
- Sagiv, Y., A. Legesse-Miller, A. Porat and Z. Elazar (2000) GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* **19**(7):1494-1504.
- Saha, T. (2012) LAMP2A overexpression in breast tumors promotes cancer cell survival via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* **8**(11).
- Saitoh, T., N. Fujita, T. Hayashi, K. Takahara, T. Satoh, H. Lee, K. Matsunaga, S. Kageyama, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, T. Kawai, K. Ishii, O. Takeuchi, T. Yoshimori and S. Akira (2009) Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(49):20842-20846.
- Sakao, E., A. Ishihara, K. Horikawa, M. Akiyama, M. Arai, M. Kato, N. Seki, K. Fukunaga, A. Shimizu-Yabe, K. Iwase, S. Ohtsuka, T. Sato, Y. Kohno, S. Shibata and M. Takiguchi (2003) Two-peaked synchronization in day/night expression rhythms of the fibrinogen gene cluster in the mouse liver. *J Biol Chem* **278**(33):30450-30457.
- Salih, D. A. and A. Brunet (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* **20**(2):126-136.
- Salvador, N., C. Aguado, M. Horst and E. Knecht (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem* **275**(35):27447-27456.
- Sandoval, H., P. Thiagarajan, S. K. Dasgupta, A. Schumacher, J. T. Prchal, M. Chen and J. Wang (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**(7201):232-235.
- Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**(5407):1488-1493.
- Sato, M. and K. Sato (2011) Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* **334**(6059):1141-1144.
- Schaeffer, V., I. Lavenir, S. Ozcelik, M. Tolnay, D. T. Winkler and M. Goedert (2012) Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain : a journal of neurology* **135**(Pt 7):2169-2177.

- Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* **17**(9):422-427.
- Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* **36**(1):30-38.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **26**(7):1749-1760.
- Schimke, R. T. (1970). Mammalian Protein Metabolism. H. N. Munro. New York, Academic Press. **4**: 177-277.
- Schnack, C., K. M. Danzer, B. Hengerer and F. Gillardon (2008) Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with Cdc42 effector proteins. *Neuroscience* **154**(4):1450-1457.
- Schweers, R. L., J. Zhang, M. S. Randall, M. R. Loyd, W. Li, F. C. Dorsey, M. Kundu, J. T. Opferman, J. L. Cleveland, J. L. Miller and P. A. Ney (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49):19500-19505.
- Seguin-Py, S. (2011). Caractérisation fonctionnelle de la protéine GABARAPL1 par identification de nouveaux partenaires protéiques et étude de l'expression de *gabarapl1* dans les cancers du sein. Sciences de la Vie et de la Santé. Besançon, Université de Franche-Comté: 275.
- Seguin-Py, S., G. Lucchi, S. Croizier, F. Z. Chakrama, G. Despouy, J. N. Le Grand, P. Ducoroy, W. Boireau, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, A. Fraichard and R. Delage-Mourroux (2012) Identification of HSP90 as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein. *Biochimie* **94**(3):748-758.
- Seibenhener, M. L., J. R. Babu, T. Geetha, H. C. Wong, N. R. Krishna and M. W. Wooten (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol* **24**(18):8055-8068.
- Seibler, P., J. Graziotto, H. Jeong, F. Simunovic, C. Klein and D. Krainc (2011) Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* **31**(16):5970-5976.
- Seiliez, I., J. Gutierrez, C. Salmeron, S. Skiba-Cassy, C. Chauvin, K. Dias, S. Kaushik, S. Tesseraud and S. Panserat (2010) An in vivo and in vitro assessment of autophagy-related gene expression in muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **157**(3):258-266.
- Sengupta, A., J. D. Molkenin, J. H. Paik, R. A. Depinho and K. E. Yutzey (2011) FoxO Transcription Factors Promote Cardiomyocyte Survival upon Induction of Oxidative Stress. *J Biol Chem* **286**(9):7468-7478.
- Sengupta, A., J. D. Molkenin and K. E. Yutzey (2009) FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **284**(41):28319-28331.
- Shen, W. and B. Ganetzky (2009) Autophagy promotes synapse development in *Drosophila*. *J Cell Biol* **187**(1):71-79.

- Shintani, T., N. Mizushima, Y. Ogawa, A. Matsuura, T. Noda and Y. Ohsumi (1999) Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J* **18**(19):5234-5241.
- Simmer, F., C. Moorman, A. M. van der Linden, E. Kuijk, P. V. van den Berghe, R. S. Kamath, A. G. Fraser, J. Ahringer and R. H. Plasterk (2003) Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* **1**(1):E12.
- Simunovic, F., M. Yi, Y. Wang, L. Macey, L. T. Brown, A. M. Krichevsky, S. L. Andersen, R. M. Stephens, F. M. Benes and K. C. Sonntag (2009) Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain : a journal of neurology* **132**(Pt 7):1795-1809.
- Smith, J. T., M. J. Cunningham, E. F. Rissman, D. K. Clifton and R. A. Steiner (2005) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* **146**(9):3686-3692.
- Smith, J. T., S. M. Popa, D. K. Clifton, G. E. Hoffman and R. A. Steiner (2006) Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* **26**(25):6687-6694.
- Sooparb, S., S. R. Price, J. Shaoguang and H. A. Franch (2004) Suppression of chaperone-mediated autophagy in the renal cortex during acute diabetes mellitus. *Kidney Int* **65**(6):2135-2144.
- Sou, Y. S., S. Waguri, J. Iwata, T. Ueno, T. Fujimura, T. Hara, N. Sawada, A. Yamada, N. Mizushima, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka and M. Komatsu (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* **19**(11):4762-4775.
- Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**(6645):839-840.
- Stapleton, D., C. Nelson, K. Parsawar, D. McClain, R. Gilbert-Wilson, E. Barker, B. Rudd, K. Brown, W. Hendrix, P. O'Donnell and G. Parker (2010) Analysis of hepatic glycogen-associated proteins. *Proteomics* **10**(12):2320-2329.
- Storch, K. F., O. Lipan, I. Leykin, N. Viswanathan, F. C. Davis, W. H. Wong and C. J. Weitz (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**(6884):78-83.
- Storvik, M., M. J. Arguel, S. Schmieder, A. Delerue-Audegond, Q. Li, C. Qin, A. Vital, B. Bioulac, C. E. Gross, G. Wong, J. L. Nahon and E. Bezard (2010) Genes regulated in MPTP-treated macaques and human Parkinson's disease suggest a common signature in prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* **38**(3):386-394.
- Suen, D. F., D. P. Narendra, A. Tanaka, G. Manfredi and R. J. Youle (2010) Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(26):11835-11840.
- Sugawara, K., N. N. Suzuki, Y. Fujioka, N. Mizushima, Y. Ohsumi and F. Inagaki (2004) The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* **9**(7):611-618.

- Sun, J., Z. Chu and S. M. Moenter (2010) Diurnal in vivo and rapid in vitro effects of estradiol on voltage-gated calcium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci* **30**(11):3912-3923.
- Sun, Q., W. Fan, K. Chen, X. Ding, S. Chen and Q. Zhong (2008) Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(49):19211-19216.
- Sun, Q., W. Fan and Q. Zhong (2009) Regulation of Beclin 1 in autophagy. *Autophagy* **5**(5):713-716.
- Suzuki, K., T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda and Y. Ohsumi (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* **20**(21):5971-5981.
- Suzuki, K., Y. Kubota, T. Sekito and Y. Ohsumi (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* **12**(2):209-218.
- Szeto, J., N. A. Kaniuk, V. Canadien, R. Nisman, N. Mizushima, T. Yoshimori, D. P. Bazett-Jones and J. H. Brumell (2006) ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy. *Autophagy* **2**(3):189-199.
- Takahashi, Y., D. Coppola, N. Matsushita, H. D. Cuaing, M. Sun, Y. Sato, C. Liang, J. U. Jung, J. Q. Cheng, J. J. Mule, W. J. Pledger and H. G. Wang (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**(10):1142-1151.
- Takahashi, Y., C. L. Meyerkord and H. G. Wang (2008) BARGaining membranes for autophagosome formation: Regulation of autophagy and tumorigenesis by Bif-1/Endophilin B1. *Autophagy* **4**(1):121-124.
- Takehige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda and Y. Ohsumi (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* **119**(2):301-311.
- Tamai, K., N. Tanaka, A. Nara, A. Yamamoto, I. Nakagawa, T. Yoshimori, Y. Ueno, T. Shimosegawa and K. Sugamura (2007) Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **360**(4):721-727.
- Tanaka, Y., G. Guhde, A. Suter, E. L. Eskelinen, D. Hartmann, R. Lullmann-Rauch, P. M. Janssen, J. Blanz, K. von Figura and P. Saftig (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* **406**(6798):902-906.
- Tanida, I., M. Komatsu, T. Ueno and E. Kominami (2003) GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun* **300**(3):637-644.
- Tanida, I., Y. S. Sou, J. Ezaki, N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno and E. Kominami (2004) HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* **279**(35):36268-36276.

- Tanida, I., E. Tanida-Miyake, T. Ueno and E. Kominami (2001) The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem* **276**(3):1701-1706.
- Tanida, I., T. Ueno and E. Kominami (2004) Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* **279**(46):47704-47710.
- Tanida, I., T. Ueno and E. Kominami (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12):2503-2518.
- Thurston, T. L., G. Ryzhakov, S. Bloor, N. von Muhlinen and F. Randow (2009) The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* **10**(11):1215-1221.
- Tolle, F., P. Y. Risold, V. Mansuy-Schlick, E. Rossi, M. Boyer-Guittaut, A. Fraichard and M. Jouvenot (2008) Specific regional distribution of *gec1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* **1210**:103-115.
- Tomoda, T., R. S. Bhatt, H. Kuroyanagi, T. Shirasawa and M. E. Hatten (1999) A mouse serine/threonine kinase homologous to *C. elegans* UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons. *Neuron* **24**(4):833-846.
- Toth, M. L., P. Simon, A. L. Kovacs and T. Vellai (2007) Influence of autophagy genes on ion-channel-dependent neuronal degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* **120**(Pt 6):1134-1141.
- Valente, E. M., P. M. Abou-Sleiman, V. Caputo, M. M. Muqit, K. Harvey, S. Gispert, Z. Ali, D. Del Turco, A. R. Bentivoglio, D. G. Healy, A. Albanese, R. Nussbaum, R. Gonzalez-Maldonado, T. Deller, S. Salvi, P. Cortelli, W. P. Gilks, D. S. Latchman, R. J. Harvey, B. Dallapiccola, G. Auburger and N. W. Wood (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**(5674):1158-1160.
- Van Humbeeck, C., T. Cornelissen, H. Hofkens, W. Mandemakers, K. Gevaert, B. De Strooper and W. Vandenberghe (2011) Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *J Neurosci* **31**(28):10249-10261.
- Van Humbeeck, C., T. Cornelissen and W. Vandenberghe (2011) Ambra1: a Parkin-binding protein involved in mitophagy. *Autophagy* **7**(12):1555-1556.
- Vazquez, P., A. I. Arroba, F. Cecconi, E. J. de la Rosa, P. Boya and F. de Pablo (2012) Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells. *Autophagy* **8**(2):187-199.
- Vernier-Magnin, S., S. Muller, M. Sallot, J. Radom, J. F. Musard, P. Adami, P. Dulieu, J. P. Remy-Martin, M. Jouvenot and A. Fraichard (2001) A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* **284**(1):118-125.
- Vernier-Magnin, S., C. Nemos, V. Mansuy, F. Tolle, L. Guichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot and A. Fraichard (2005) Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated *gec1*/GABARAPL1 gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochim Biophys Acta* **1731**(1):23-31.



- von Walden, F., F. Jakobsson, L. Edstrom and G. A. Nader (2012) Altered autophagy gene expression and persistent atrophy suggest impaired remodeling in chronic hemiplegic human skeletal muscle. *Muscle Nerve* **46**(5):785-792.
- VonVoigtlander, P. F., R. A. Lahti and J. H. Ludens (1983) U-50,488: a selective and structurally novel non-Mu ( $\kappa$ ) opioid agonist. *J Pharmacol Exp Ther* **224**(1):7-12.
- Wairkar, Y. P., H. Toda, H. Mochizuki, K. Furukubo-Tokunaga, T. Tomoda and A. DiAntonio (2009) Unc-51 controls active zone density and protein composition by downregulating ERK signaling. *J Neurosci* **29**(2):517-528.
- Wang, H., F. K. Bedford, N. J. Brandon, S. J. Moss and R. W. Olsen (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* **397**(6714):69-72.
- Wang, Q. J., Y. Ding, D. S. Kohtz, N. Mizushima, I. M. Cristea, M. P. Rout, B. T. Chait, Y. Zhong, N. Heintz and Z. Yue (2006) Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* **26**(31):8057-8068.
- Wang, X., D. Winter, G. Ashrafi, J. Schlehe, Y. L. Wong, D. Selkoe, S. Rice, J. Steen, M. J. LaVoie and T. L. Schwarz (2011) PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* **147**(4):893-906.
- Wang, Y., S. L. Dun, P. Huang, C. Chen, Y. Chen, E. M. Unterwald, N. J. Dun, E. J. Van Bockstaele and L. Y. Liu-Chen (2006) Distribution and ultrastructural localization of GEC1 in the rat CNS. *Neuroscience* **140**(4):1265-1276.
- Wang, Y., M. Martinez-Vicente, U. Kruger, S. Kaushik, E. Wong, E. M. Mandelkow, A. M. Cuervo and E. Mandelkow (2009) Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet* **18**(21):4153-4170.
- Watanabe, Y., H. Tatebe, K. Taguchi, Y. Endo, T. Tokuda, T. Mizuno, M. Nakagawa and M. Tanaka (2012) p62/SQSTM1-Dependent Autophagy of Lewy Body-Like alpha-Synuclein Inclusions. *PLoS One* **7**(12):e52868.
- Waters, S., K. Marchbank, E. Solomon, C. Whitehouse and M. Gautel (2009) Interactions with LC3 and polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover. *FEBS Lett* **583**(12):1846-1852.
- Weidberg, H., E. Shvets, T. Shpilka, F. Shimron, V. Shinder and Z. Elazar (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* **29**(11):1792-1802.
- Weissman, A. M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3):169-178.
- Wild, P., H. Farhan, D. G. McEwan, S. Wagner, V. V. Rogov, N. R. Brady, B. Richter, J. Korac, O. Waidmann, C. Choudhary, V. Dotsch, D. Bumann and I. Dikic (2011) Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* **333**(6039):228-233.
- Wong, E. and A. M. Cuervo (2010) Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* **13**(7):805-811.

- Wooten, M. W., T. Geetha, J. R. Babu, M. L. Seibenhener, J. Peng, N. Cox, M. T. Diaz-Meco and J. Moscat (2008) Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* **283**(11):6783-6789.
- Xie, Z., U. Nair and D. J. Klionsky (2008) Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**(8):3290-3298.
- Xin, Y., L. Yu, Z. Chen, L. Zheng, Q. Fu, J. Jiang, P. Zhang, R. Gong and S. Zhao (2001) Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein. *Genomics* **74**(3):408-413.
- Yamada, T., A. R. Carson, I. Caniggia, K. Umebayashi, T. Yoshimori, K. Nakabayashi and S. W. Scherer (2005) Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J Biol Chem* **280**(18):18283-18290.
- Yamaguchi, M., K. Matoba, R. Sawada, Y. Fujioka, H. Nakatogawa, H. Yamamoto, Y. Kobashigawa, H. Hoshida, R. Akada, Y. Ohsumi, N. N. Noda and F. Inagaki (2012) Noncanonical recognition and UBL loading of distinct E2s by autophagy-essential Atg7. *Nat Struct Mol Biol*.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki and Y. Tashiro (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct* **23**(1):33-42.
- Yan, J., H. Kuroyanagi, A. Kuroiwa, Y. Matsuda, H. Tokumitsu, T. Tomoda, T. Shirasawa and M. Muramatsu (1998) Identification of mouse ULK1, a novel protein kinase structurally related to *C. elegans* UNC-51. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(1):222-227.
- Yan, J., H. Kuroyanagi, T. Tomemori, N. Okazaki, K. Asato, Y. Matsuda, Y. Suzuki, Y. Ohshima, S. Mitani, Y. Masuho, T. Shirasawa and M. Muramatsu (1999) Mouse ULK2, a novel member of the UNC-51-like protein kinases: unique features of functional domains. *Oncogene* **18**(43):5850-5859.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2009) An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* **335**:1-32.
- Yla-Anttila, P., H. Vihinen, E. Jokitalo and E. L. Eskelinen (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**(8):1180-1185.
- Young, A. R., E. Y. Chan, X. W. Hu, R. Kochl, S. G. Crawshaw, S. High, D. W. Hailey, J. Lippincott-Schwartz and S. A. Tooze (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* **119**(Pt 18):3888-3900.
- Young, J. E., R. A. Martinez and A. R. La Spada (2009) Nutrient deprivation induces neuronal autophagy and implicates reduced insulin signaling in neuroprotective autophagy activation. *J Biol Chem* **284**(4):2363-2373.
- Yu, Q. C. and L. Marzella (1986) Modification of lysosomal proteolysis in mouse liver with taxol. *Am J Pathol* **122**(3):553-561.

- Yue, Z., L. Friedman, M. Komatsu and K. Tanaka (2009) The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **1793**(9):1496-1507.
- Zatloukal, K., C. Stumptner, A. Fuchsbichler, H. Heid, M. Schnoelzer, L. Kenner, R. Kleinert, M. Prinz, A. Aguzzi and H. Denk (2002) p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* **160**(1):255-263.
- Zeng, X., J. H. Overmeyer and W. A. Maltese (2006) Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* **119**(Pt 2):259-270.
- Zhang, Y., F. Wang, L. Han, Y. Wu, S. Li, X. Yang, Y. Wang, F. Ren, Y. Zhai, D. Wang, B. Jia, Y. Xia and Z. Chang (2011) GABARAPL1 negatively regulates Wnt/beta-catenin signaling by mediating Dvl2 degradation through the autophagy pathway. *Cell Physiol Biochem* **27**(5):503-512.
- Zhao, C., K. Dahlman-Wright and J. A. Gustafsson (2010) Estrogen signaling via estrogen receptor {beta}. *J Biol Chem* **285**(51):39575-39579.
- Zhao, J., J. J. Brault, A. Schild, P. Cao, M. Sandri, S. Schiaffino, S. H. Lecker and A. L. Goldberg (2007) FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**(6):472-483.
- Zheng, Y. T., S. Shahnazari, A. Brech, T. Lamark, T. Johansen and J. H. Brumell (2009) The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* **183**(9):5909-5916.
- Zhong, Y., Q. J. Wang, X. Li, Y. Yan, J. M. Backer, B. T. Chait, N. Heintz and Z. Yue (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* **11**(4):468-476.
- Zhou, X., J. R. Babu, S. da Silva, Q. Shu, I. A. Graef, T. Oliver, T. Tomoda, T. Tani, M. W. Wooten and F. Wang (2007) Unc-51-like kinase 1/2-mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14):5842-5847.

# **ANNEXES**

---



## **PUBLICATIONS**



**PUBLICATION III : GABARAPL1 (GEC1) Original or copycat?**

**Jaclyn Nicole Le Grand**, Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot and Michaël Boyer-Guittaut

*Autophagy* (2011) 7:10, 1-10.





# GABARAPL1 (GEC1)

## Original or copycat?

Jaclyn Nicole Le Grand,<sup>†</sup> Fatima-Zahra Chakrama,<sup>†</sup> Stéphanie Seguin-Py,<sup>†</sup> Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Michèle Jouvenot and Michaël Boyer-Guittaut\*

Université de Franche-Comté; Laboratoire de Biochimie; EA3922; Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central; IFR133, U.F.R. Sciences et Techniques; Besançon, France

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Keywords:** GEC1, GABARAPL1, GABARAP, LC3, autophagy, cancer, neurodegenerative diseases, estrogens

**Abbreviations:** AMPA receptor,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor; AP-1, activator protein-1; Atg, autophagy-related; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; FoxO, forkhead box proteins; GABA<sub>A</sub>, gamma-aminobutyric acid type A; GABA<sub>A</sub>R, gamma-aminobutyric acid type A receptor GABARAP; GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein GABARAPL1, GABARAPL2, GABARAPL3, GABARAP-like 1, 2 and 3; GATE-16, Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; GEC1, glandular epithelial cell protein 1; GFP, green fluorescent protein; GnRH, gonadotropin releasing hormone; KOR, kappa opioid receptor; MAP1LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; NBR1, neighbor of BRCA1; NSF, N-ethylmaleimide sensitive factor; *Per1*, period 1 gene; SN, substantia nigra; SNpc, substantia nigra pars compacta; SP-1, specificity protein-1; SQSTM1, sequestosome-1

The *GABARAPL1* (*GABARAP-LIKE 1*) gene was first described as an early estrogen-regulated gene that shares a high sequence homology with *GABARAP* and is thus a part of the *GABARAP* family. *GABARAPL1*, like *GABARAP*, interacts with the GABA<sub>A</sub> receptor and tubulin and promotes tubulin polymerization. The *GABARAP* family members (*GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2*) and their close homologs (LC3 and Atg8) are not only involved in the transport of proteins or vesicles but are also implicated in various mechanisms such as autophagy, cell death, cell proliferation and tumor progression. However, despite these similarities, *GABARAPL1* displays a complex regulation that is different from that of other *GABARAP* family members. Moreover, it presents a regulated tissue expression and is the most highly expressed gene among the family in the central nervous system. In this review article, we will outline the specific functions of this protein and also hypothesize about the roles that *GABARAPL1* might have in several important biological processes such as cancer or neurodegenerative diseases.

### Introduction

The *GEC1* gene (also known as *GABARAPL1* or *ATG8L*) was first identified in 1993 as an early estrogen-induced gene in quiescent guinea-pig endometrial glandular epithelial cells (GEC).<sup>1,2</sup> In 1999, a new protein named *GABARAP*

(GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein) was described to bind both GABA<sub>A</sub>R ( $\gamma$ -aminobutyric acid receptor) and tubulin, and to be involved in intracellular GABA<sub>A</sub> receptor trafficking.<sup>3</sup> The discovery of this new protein, which shares 87% identity with *GABARAPL1*, led to the classification of *GEC1* as a member of the *GABARAP* family.<sup>4</sup> We therefore propose to unify the somewhat confusing nomenclature and spelling of this protein and to refer to *GEC1* (or *GABARAP-L1*) as *GABARAPL1* (GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein-like 1).

In this review, we will show that although *GABARAPL1* shares a high sequence homology with other *GABARAP* family members, its expression pattern and regulation differ. Together, these findings suggest that *GABARAPL1* might have essential and specific functions.

### The GABARAP Family

*GABARAPL1* belongs to the *GABARAP* family, which is one of 2 subfamilies of the yeast Atg8 (autophagy-related 8) ortholog, the other being the MAP-LC3s (consisting of the light-chain of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B and MAP1C, also known as LC3A, LC3B and LC3C). The *GABARAP* family comprises *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2*/GATE-16 (GABARAP-like 2/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa) (Fig. 1). *GABARAPL1* shows 87% identity with *GABARAP* and 61% identity with GATE-16<sup>5,6</sup> and also shares a distant homology with LC3A (30.8% identity), LC3B (29% identity) and LC3C (35.8% identity).<sup>7-10</sup> Members of the *GABARAP* and LC3 families are composed of 117 to 145 amino acids and all possess a conserved C-terminal glycine, essential for their role in autophagy (Fig. 1).<sup>11,12</sup> In addition to their sequence similarity, the crystal structures of *GABARAP*,<sup>13-17</sup> GATE-16,<sup>6</sup> LC3,<sup>18</sup> and

\*Correspondence to: Michaël Boyer-Guittaut; Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr  
Submitted: 12/18/10; Revised: 04/05/11; Accepted: 04/18/11  
DOI:

GABARAPL1	MKFQYKEDHPFEYRKKEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARVPDLDRKRYLVPSDLTVGQF-60
GABARAP	MKFVYKEEHPFEKRSEGEKIRKKYPDRVPVIVEK-APKARIGDLDDKKRYLVPSDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLERHRCVESAKIRAKYPDRVPVIVEK-VSGSQIVDIDKRYLVPSDITVAQF-60
LC3A	MKMRFFSSPCGKAAVDPADRCKEVQQIRDQHPSKI PVI IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKI PVI IERYKGEKQLPVLDKTKFLVPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKI PVVVERYPRETFLPPLDKTKFLVPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFEKRKAESERADRPFKNRIPVICEK-AEKSDIPEIDKRYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFFVN-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESVMYGL-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFFVN-NVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESVMYGL-117
GABARAPL2	MWIIRKRIQLPSEKATFLFVD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEDGFLYVAYSAGENTFGF-117
LC3A	VKIIRRLQLNPTQAFLLVNHQSMVSVSTPIADIYEQEKDEDGFLYVMVYASQETFGF-125
LC3B	IKIIRRLQLNANQAFLLVNHGSMVSVSTPISEVYSEKDEDGFLYVMVYASQETFGMKLSV-125
LC3C	LSIIRSRMVLRATEAFYLLVNNKSLVMSATMAEIRDYKDEDGFVMTYASQETFGCLESAAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRIMLPPEKATIFIFVN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFLYVTVSYAGENTFGR-117

**Figure 1.** Alignment of the GABARAP and LC3 family members. Amino acid sequences (obtained from NCBI or GeneBank databases) of GABARAPL1 (NP\_113600), GABARAP (CAG47031), GABARAPL2 (NP\_009216), LC3A (NP\_852610), LC3B (NP\_073729), LC3C (NP\_001004343) and Atg8 (NP\_009475) proteins were aligned using the NCBI Protein BLAST tool. The amino acids that differ from those present in GABARAPL1 are indicated in red. The terminal glycine (position 116, 120 or 124), which is essential for conjugation to phospholipids, is displayed in blue.

GABARAPL1 (Structural Genomic Consortium, code: 2R2Q) are also highly similar. It is also worth mentioning that the GABARAPL1 protein sequence is highly conserved throughout evolution from plants to mammals (100% identity) suggesting that this protein plays an essential role in these organisms.<sup>4,7</sup>

### Regulation and Expression of the GABARAPL1 Gene

*GABARAPL1* mRNA is expressed in a variety of tissues within the mouse, rat and human. The highest expression levels were initially observed in the brain, heart, liver, skeletal muscle, kidney, spleen, ovary, small intestine, placenta and peripheral blood leukocytes.<sup>4,7,19</sup> In contrast to its differential expression in adult human tissues, *GABARAPL1* is present at comparable mRNA levels in all fetal tissues.<sup>20</sup>

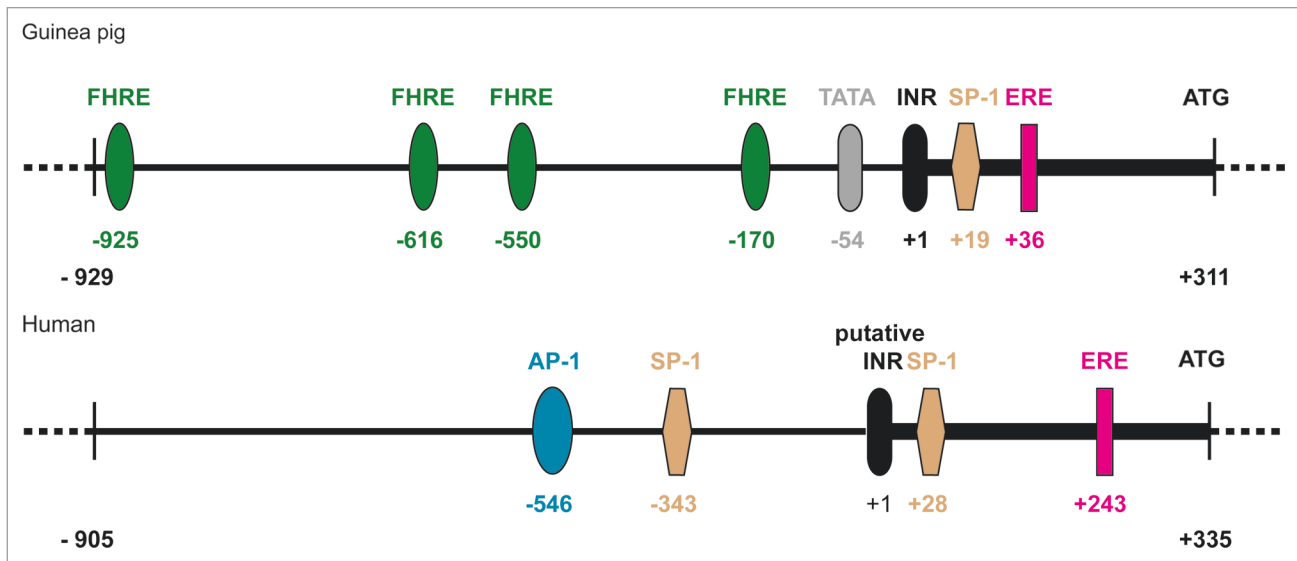
**Regulation by estrogen.** The human and guinea pig *GABARAPL1* cDNA consist of 1,959 and 1,921 nucleotides, respectively. Their coding sequences are composed of 351 nucleotides, which share 93% identity and translate into the exact same protein. The guinea-pig *Gabarapl1* gene has a full-length ERE sequence (estrogen responsive element, reviewed in ref. 21) that is located in the first exon and described as the primary response element necessary for gene activation by Estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) via ER $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ ).<sup>22</sup>

Sequence analysis of the human *GABARAPL1* gene (on chromosome 12) by the MatInspector program from Genomatix<sup>23</sup> or the Cister software<sup>24</sup> reveals the presence of several possible regulatory sequences such as ERE, SP-1 (Specificity Protein-1) and AP-1 (Activator Protein-1), to which estrogen receptors could bind (Fig. 2).<sup>25,26</sup> However, the precise functions of these sequences have not yet been determined.

In contrast, analysis of the DNA sequences of *GABARAP* (on chromosome 17), *GABARAPL2* (on chromosome 16) and

*LC3A*, *B* and *C* (on chromosomes 20, 16 and 1, respectively) did not indicate the presence of any ERE in the 1,200 bp region upstream of the initial start codon. Indeed, no other *GABARAP* or *LC3* family member has been shown to be upregulated by estrogen as is the case for *GABARAPL1*. This specific regulation of the *GABARAPL1* gene by estrogen might indicate that it exerts particular functions in tissues or pathologies in which estrogens play a major role such as breast cancer or Parkinson disease as discussed further below.

**Expression in the central nervous system.** Real-time RT-PCR experiments performed on mRNA from male rat cerebral extractions showed that *Gabarapl1* displays the highest expression levels followed by *Lc3*, *Gabarap* and *Gabarapl2*.<sup>27</sup> Transcript expression levels of each member, however, differ depending on the specific region of the brain. *Gabarapl1* mRNA is the most highly expressed in all regions of the brain examined and its expression is the highest in the pons and diencephalon (thalamus and hypothalamus).<sup>27</sup> These results were confirmed in the adult rat using in situ hybridization experiments, which showed that *Gabarapl1* is indeed widely expressed in the brain, most likely exclusively within neurons, ranging from the olfactory bulb to the brain stem and spinal cord.<sup>28</sup> More specifically, *Gabarapl1* appears to be expressed more predominantly in neurons that are involved in somatomotor and neuroendocrine functions and to a lesser extent in sensory and reticular structures.<sup>28</sup> *Gabarapl1* is also highly expressed in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons,<sup>29,30</sup> a neuronal population that is regulated by estrogen. Indeed, estrogen receptors are highly expressed in the hypothalamus<sup>21,29</sup> and play a major role in the regulation of the reproductive axis through their control on the release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone at the anterior pituitary. Moreover, the primary neurotransmitter inputs to these neurons are GABA<sub>A</sub> and glutamate, which exert their effects in the neurons through GABA<sub>A</sub> receptors



**Figure 2.** Comparison of the human and guinea pig *GABARAPL1* gene promoter regions. Predictive computer analysis was conducted on promoter sequences. In the guinea pig gene, the INR element is sufficient to direct transcription and the ERE located in the first exon permits induction of the gene by Estradiol-17 $\beta$  via ER $\alpha$ .<sup>4</sup> These sequences are conserved in the human gene but their roles have not yet been addressed. A similar analysis of the equivalent region for the *GABARAP* gene revealed no estrogen responsive cis-regulatory sequences. AP-1: binding site of the Activator Protein-1; SP-1: binding site of the transcription factor Specificity Protein-1; ERE: Estrogen Response Element; FHRE: ForkHead Responsive Element; INR: transcription initiator element; TATA: TATA box; Atg: translation initiation codon. Cister and Matinspector softwares were used to predict the presence of estrogen response cis-regulatory sequences.<sup>23,24</sup> Only sequences identified by both software programs are represented in the figure. Matinspector software was used to predict FHRE.

and glutamate receptors, respectively.<sup>31,32</sup> As an estrogen-regulated gene, *Gabarap1l* may play a role in the responsiveness of GnRH neurons to estrogen through its implication in GABA<sub>A</sub> R trafficking to the plasma membrane.

**Regulation by circadian rhythms.** In mammals, the central pacemaker in the hypothalamus, the suprachiasmatic nucleus, and the intracellular oscillation generators within several peripheral organs all work together to generate circadian oscillation.<sup>33,34</sup> Two separate studies have shown that *Gabarap1l* expression varies depending on the day/night rhythms.<sup>30,35</sup> The first study showed that *Gabarap1l* expression peaks halfway through the light phase of a 24-h cycle (12 h light/12 h dark) in mouse liver.<sup>35</sup> The second study demonstrated that *Gabarap1l* expression is temporally related to the oscillations of Circadian Locomotor Output Cycle Kaput (Clock) transcription factors and dependent on *Period 1* (*Per1*) expression in GnV-3 cells (conditionally immortalized gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons from rat).<sup>30</sup> Among the *Gabarap* and *Lc3* family members, *Gabarap1l* is the only gene identified thus far to be regulated by circadian rhythms.

Several recent publications have hypothesized a relationship between autophagy and circadian rhythms, although the mechanism is not yet determined (reviewed in ref. 36). It has been shown that the autophagy-related genes *Vps4b* and *Bnip3*, like *Gabarap1l*, undergo rhythmic variations. *Gabarap1l* may, therefore, be regulated by *Per1* in order to participate or regulate autophagy during the diurnal cycle. Moreover, unlike the studies done on *Vps4b* and *Bnip3*,<sup>37</sup> *Gabarap1l*'s rhythmic expression was demonstrated in vitro, suggesting that autophagic activity may vary intrinsically in the cell, independent of the circadian pattern

of the whole animal. This finding may indicate that *Gabarap1l* is particularly important for the specific autophagic degradation of unwanted proteins in the cell and not just involved in nutrient recycling, a hypothesis that will require further examination.

**Regulation by the FoxO transcription factor family.** Several groups have demonstrated that *Gabarap1l* is regulated by FoxO transcription factors. For instance, Sengupta and colleagues found that, in primary cultures of both cardiomyocytes from neonatal rats and mouse heart tissue, stress conditions, such as glucose deprivation or oxidative stress, cause the translocation of FoxO1 and FoxO3 to the nucleus, where they activate autophagy-related genes (*Gabarap1l*, *Atg12* and *Lc3*) and a *FoxO1/FoxO3* conditional double-knockout mouse displays reduced expression of *Gabarap1l* and *Lc3-II* following ischemia/reperfusion injury.<sup>38,39</sup> Another study indicated that the effects of insulin suppression on autophagy are mediated by a FoxO1-dependent transcription of genes implicated in autophagy (*Gabarap1l*, *Atg12* and *Vps34*).<sup>40</sup> Furthermore, *Gabarap1l* as well as several other genes implicated in either the process or the regulation of autophagy (*Bnip3*, *Bnip3l*, *Vps34*, *Lc3*, *Atg12*, *Beclin 1* and *Atg4B*) are upregulated in a model of muscle atrophy in vivo.<sup>41,42</sup> A recent study linked FoxO, AMPK and p38 $\alpha$  in colorectal cancer cells (CRC) during stress-response. In this study, the authors used an inhibitor of p38 $\alpha$  (SB20219) to study the expression of FoxO3A target genes and demonstrated that, of the genes involved in autophagy, *GABARAPL1* shows the highest transcriptional induction after treatment and accumulates in autolysosomes.<sup>43</sup>

Three FoxO target consensus sequences are located upstream of the promoter region in the mouse *Gabarap1l* gene<sup>44</sup> and

4 potential FoxO binding sites are present in the guinea pig gene (Fig. 2). While no FoxO binding sites are found in the human gene within the homologous region, they are present further upstream (2–3 kb respective to the start codon) in the human gene. Interestingly, even if *GABARAPL1* is not the only member of the *GABARAP* family found to be regulated by FoxO transcription factors, it is regulated by several FoxO transcription factors and in different physiological processes such as muscle atrophy or colorectal cancer, therefore demonstrating its wide range of action.

**Expression and localization of the GABARAPL1 protein.** As the protein sequences among the *GABARAP* family members, and in particular between *GABARAP* and *GABARAPL1*, share a high identity, a detailed analysis of their differential expression has been limited. To avoid the use of nonspecific antibodies, research efforts have focused on the analysis of *GABARAPL1* mRNA expression since mRNA probes, complementary to the 3'-untranslated region of the gene, are able to specifically identify *GABARAPL1*.

Despite the lack of a *GABARAPL1*-specific antibody,<sup>27,28,45</sup> some tissue expression analysis has been performed. High levels of *GABARAPL1* have been found in the brain, in neurons but not in glial cells, and in the lungs.<sup>46</sup> In addition, *GABARAPL1* protein levels decrease in the failing human heart after mechanical unloading, possibly due to a decreased demand in energy from the heart during this process.<sup>47</sup> Nevertheless, it is important to point out that it cannot be excluded that, in these studies, several members of the *GABARAP* family have been detected and not only *GABARAPL1*.

Cell lines that stably express *GABARAPL1* linked to a fluorescent tag have also been utilized for protein expression experiments. These studies have shown that the cellular distribution of *GABARAPL1* is highly variable, including the cytoplasm, Golgi complex, endoplasmic reticulum or the plasma membrane, but with a common feature, a staining linked to intracytoplasmic vesicles that can partially colocalize with autophagosomes or lysosomes.<sup>45,46,48,49</sup> Although these experiments make it possible to determine the expression pattern of exogenous *GABARAPL1*, the cellular distribution of endogenous *GABARAPL1* remains to be confirmed.

Taken together these data show that *GABARAPL1* displays a specific regulation (estrogens and circadian rhythms) not shared by the other members of the *GABARAP* and *LC3* families. This regulation might allow the investigators to use specific inducers targeting only one member of these families. Nevertheless, several points will need to be addressed in the future: Do the differences observed at the mRNA level reflect differences at the protein level? Is this specific regulation linked to any cellular process, such as autophagy, or pathologies, such as cancer and neurodegenerative disease?

### The Role of GABARAPL1 in Neuronal Signal Transmission

GABA<sub>A</sub> receptors are ligand-gated chloride ion channels found at neuronal synapses and are responsible for the majority of the

fast inhibitory transmission in the brain.<sup>50,51</sup> They are involved in many different physiological processes such as anxiety, circadian rhythm, memory, learning, controlling excitability of the brain, synaptic plasticity and synaptogenesis.<sup>52</sup> It has been recently demonstrated that Gabarap11 interacts with tubulin and the  $\gamma 2$  subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor and is able to promote tubulin polymerization and bundling to form microtubules.<sup>45,49,53</sup> A similar role for the Gabarap protein has also been previously demonstrated, suggesting that the 2 proteins are redundant with regard to this function.<sup>3,54</sup>

This idea has been confirmed with the creation of the *Gabarap* knockout mouse.<sup>55</sup> These mice lack a phenotype, they do not display any change in localization or number of GABA<sub>A</sub> receptors, nor are Gabarap11 or Gabarap12 protein levels upregulated. siRNA knockdown of *Gabarap* in primary hippocampal neurons also gave similar results.<sup>56</sup> A double-knockout mouse of both *Gabarap* and *Gabarap11* will therefore be essential in order to evaluate their collective role and to determine the role of the third member of the family, *Gabarap12*, has in the transport of GABA<sub>A</sub> receptors in vivo.

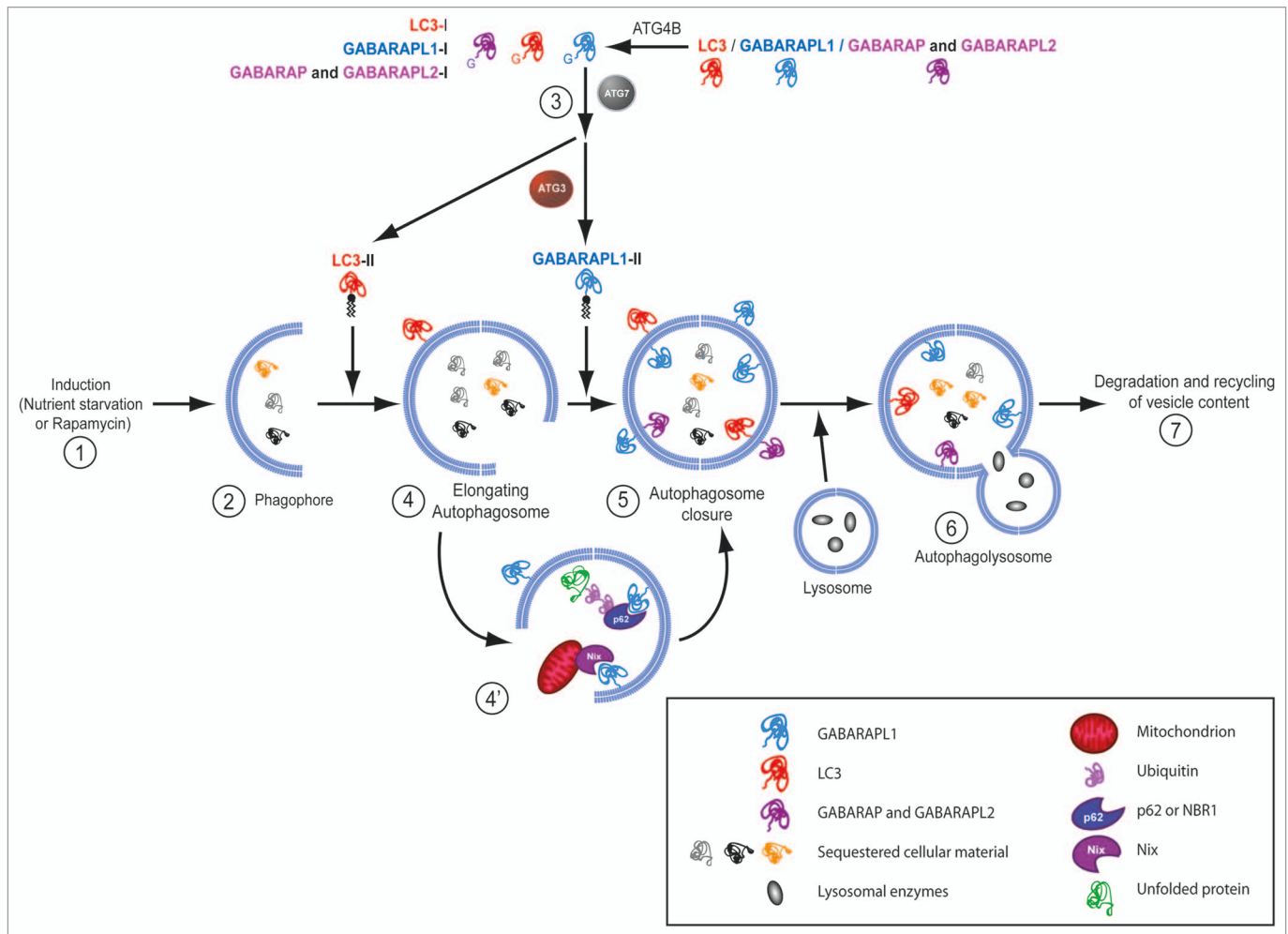
Interestingly, N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) was also identified as a Gabarap11 binding partner in rat brain extracts and Chinese hamster ovary cells.<sup>45</sup> Although the relevance of the Gabarap11/NSF interaction has not yet been elucidated, it is likely that this complex will be involved in the trafficking of neuronal receptors as it has been described for the Gabarap/NSF and Gabarap12/NSF complexes.<sup>5,57</sup>

Another protein partner of Gabarap11 is the kappa opioid receptor (KOR), which is a member of the G-protein coupled receptor family.<sup>45</sup> Immunocytochemical studies show that Gabarap11 colocalizes with the KOR in the endoplasmic reticulum and Golgi where it appears to increase the number of cell-surface receptors.<sup>45</sup> KOR/Gabarap11 binding involves hydrophobic interactions<sup>53</sup> and the Gabarap11 residues that are responsible for these interactions are highly conserved in Gabarap and Gabarap12. However, compared with Gabarap11, Gabarap and Gabarap12 affect the transport of the KOR to a lesser extent. Moreover, Gabarap11 displays a higher affinity for KOR and, unlike Gabarap, can associate with and enhance the expression of this receptor without being processed at its G116 residue and associated to membranes.<sup>58</sup> These data suggest a different role of these proteins in the transport of the kappa opioid receptor. The residues within the opioid receptor that are necessary for Gabarap11 interaction are located within a FPXXM motif at its C terminus. This motif is also present in the GluR1 (glutamate receptor type 1) subunit of the AMPA receptor and in the prostaglandin receptor EP3.f. The expression of these receptors is increased as a result of Gabarap11 overexpression, suggesting that Gabarap11 has a role that is more complex than merely in receptor transport.<sup>53</sup> Indeed, the authors of the previous study suggest that Gabarap11 might act as a chaperone for the KOR and possibly other proteins.

### The Role of GABARAPL1 in Autophagy

Autophagy is a highly catabolic process leading to the degradation of cytoplasmic components and sometimes also the degradation





**Figure 3.** Role of GABARAPL1 in autophagy. GABARAP, GABARAPL2 and LC3 are cleaved in the cell by Atg4 enzymes to produce their mature forms; GABARAPL1-I, GABARAP-I, GABARAPL2-I and LC3-I. Under autophagy-inducing conditions (e.g., stimulation with rapamycin or nutrient starvation) (1), nucleation of phagophores is initiated (2) and followed by elongation of the pre-autophagosomal membrane, which leads to the creation of autophagosomes. During this process, GABARAPL1-I, GABARAP-I, GABARAPL2-I and LC3-I are conjugated to phospholipids by Atg7 and Atg3 (3) to produce the phospholipid-linked forms GABARAPL1-II, GABARAP-II, GABARAPL2-II and LC3-II. LC3-II is essential for elongation of autophagosomes (4), whereas GABARAP-II, GABARAPL1-II and GABARAPL2-II are required for the closure of autophagosomes (5). Autophagosomes then undergo maturation into autophagolysosomes (6), resulting in the degradation of their content and the recycling of the breakdown products (7). GABARAPL1 is also involved in selective autophagy through its interaction with cargo adaptor proteins, such as Nix, p62 or NBR1, to activate the clearance of specific unwanted proteins or organelles (4').

of the cell as a whole. It has been implicated in many biological processes from development to disease states (reviewed in ref. 59 and 60). Numerous recent studies have focused on elucidating the molecular mechanism of this process and it is now known that the elongation of the phagophore is regulated by 2 conjugation systems.<sup>61</sup> The first system involves the conjugation of Atg12 to Atg5 by the Atg7 and Atg10 enzymes. The second involves the conjugation of the LC3 protein onto phosphatidylethanolamine by the Atg7 and Atg3 enzymes (reviewed in ref. 62). Before conjugation, the precursor form of LC3 is cleaved by the cysteine protease Atg4B, a member of the Atg4 family of endopeptidases, to expose a glycine residue at its C terminus (Fig. 1). The mature LC3 is then attached to its target phospholipid, typically a phosphatidylethanolamine on the forming autophagosomal structure in vitro and in vivo (Fig. 3), or even a phosphatidylserine in vitro.

This difference is thought to be governed by yet unidentified 'selective factors' that are only present in vivo.<sup>63</sup>

Recently, Gabarapl1 has been described as a new marker of autophagosomes<sup>48</sup> and can be cleaved by Atg4B in vitro, a maturation step described to be inhibited in *Atg4B*<sup>-/-</sup> mice.<sup>48,64,65</sup> The loss of the maturation of the Gabarap family members by Atg4B in this in vivo model leads to balance disorders owing to a loss of autophagic function within the inner ear. Another recent study shows that the proteins of the Atg8 family are involved in the formation of the autophagosomes but display different and specific function during this process: the LC3 family is necessary for the elongation of the phagophore, whereas the GABARAP family is implicated in later stages of the formation of the autophagosome.<sup>66</sup>

One main question remains: What is the specificity of function of the GABARAP and LC3 family members in autophagy?

Deletion of *Gabarap* does not result in an increased expression of *Gabarapl1* or *Gabarapl2*.<sup>55</sup> Similarly, *Lc3 $\beta$*  knockout mice do not display a compensation of *Lc3 $\alpha$*  or *Gabarap* expression.<sup>67</sup> As such, one could assume that the members of each subfamily are simply redundant. Nevertheless, given their specific expression patterns, their role in autophagy might be tissue or cell specific or linked to specific types of autophagy such as selective autophagy as described below.

### The Role of GABARAPL1 in Selective Autophagy

The autophagic pathway has evolved to include more specific processes in which certain autophagic targets are selected via autophagic receptors such as sequestosome1 (SQSTM1, also known as p62) or neighbor of Brca1 (NBR1).<sup>68-70</sup> These proteins act as cargo adapters and connect the ubiquitinated target proteins, protein aggregates or damaged organelles to the autophagosome-linked GABARAP and LC3 family members. They do so by binding both the cargo (i.e., the material to be sequestered) via their C-terminal ubiquitin-associated domain (UBA)<sup>71</sup> and the LC3 or GABARAP family members via their LC3-interacting domain (LIR).<sup>69</sup> Indeed, GABARAPL1 interacts with both p62 and NBR1,<sup>69,72,73</sup> and the interaction between GABARAPL1 and p62 facilitates the autophagy of ubiquitinated protein aggregates.<sup>69</sup> GABARAPL1 is also thought to be involved in mitophagy through its interaction with the mitochondria-associated protein NIX1 and its recruitment to damaged mitochondria in vitro.<sup>74</sup> It is therefore likely that GABARAPL1 constitutes a protein target for cargo adapters and thus is necessary for the degradation of unwanted organelles or protein aggregates, a function that could prove to be useful for the therapy of various diseases, such as cancer or neurodegeneration. Therefore, it will be of great interest in the future to determine whether the GABARAP and LC3 family members play redundant roles in this process or are involved in the degradation of different targets that are associated with specific pathologies, such as  $\alpha$ -synuclein in Parkinson disease<sup>75</sup> or p62 in cancer.<sup>76</sup>

### The Role of GABARAPL1 in Cancer

The first evidence for a potential role of GABARAPL1 and GABARAP in cancer was a study that described reduced *GABARAPL1* expression in different cancerous cell lines compared with normal tissues.<sup>19</sup> More recently, we investigated *GABARAPL1* expression in a large cohort of breast adenocarcinoma (265 samples)<sup>77</sup> and demonstrated that those patients who presented with high *GABARAPL1* expression levels had a lower risk of metastasis, specifically for lymph node-positive patients. Moreover, decreased *GABARAPL1* expression correlates with clinic-pathological features such as the histological grade of a given tumor. Reduced levels of *GABARAPL1* mRNA are observed in tumors of high histological grade, with lymph node-positive and estrogen- and/or progesterone receptor-negative status. These results suggest a role for *GABARAPL1* as a prognostic marker in breast cancer, specifically in lymph node-positive patients. Like *GABARAPL1*, *GABARAP* expression is also diminished in

breast cancer cell lines, both at the mRNA and protein levels.<sup>78</sup> *GABARAP* also has a role in other cancers as *GABARAP* transcript expression correlates with a better survival rate for patients affected by neuroblastoma,<sup>79</sup> and *GABARAP* protein expression is significantly upregulated in colorectal cancer.<sup>80</sup>

Autophagy has been described to play a paradoxical role in tumor apparition and progression. Early in the process of tumorigenesis, autophagy prevents tumor progression by degrading damaged organelles such as mitochondria, which would otherwise be stressors in the cell.<sup>81,82</sup> Under metabolic stress, and at later stages of tumorigenesis, however, some tumors exploit their autophagic capabilities in order to provide themselves with the necessary nutrients to survive (reviewed in ref. 83–85). Later on, autophagy is also responsible for the development of drug resistance in many cancers.<sup>86</sup> Since GABARAPL1 is regulated by estrogens, and its gene expression is a good prognostic indicator for breast cancer patients,<sup>77</sup> it has a tremendous potential as a therapeutic target against cancer. In fact, anti-estrogen treatments (tamoxifen) are currently being combined with an inhibitor of autophagy (chloroquine) in clinical trials to treat breast cancer.<sup>86</sup>

### The Role of GABARAPL1 in Neurodegeneration

In the last decade, there has been a growing body of evidence that supports a role for autophagy in the protection against unwanted protein aggregates in the brain. Anomalies in the autophagic process have been discovered in many neurodegenerative diseases including, but certainly not limited to, Alzheimer, Huntington and Parkinson diseases (reviewed in ref. 87). As discussed above, GABARAPL1 interacts with the autophagy cargo adaptors p62 and NBR1, which bind to ubiquitinated protein aggregates to identify them for degradation.<sup>68-70</sup>

However, GABARAPL1 not only binds to these autophagy cargo adaptors, but also confers an affinity for those mutated proteins that form aggregates in neurodegenerative diseases, such as  $\alpha$ -synuclein oligomers in Parkinson disease.<sup>88</sup> Moreover, *Gabarapl1* mRNA is highly expressed in the *substantia nigra pars compacta* (*SNpc*), the region of the *SN* that consists of dopaminergic neurons, implicated in the progression of Parkinson disease, whereas its expression is lacking in the *pars reticularis*.<sup>28</sup> Two recent microarray analysis showed that *GABARAPL1* expression, but not *GABARAP* or *LC3*, is significantly reduced in the prefrontal cortex of macaque monkeys in an MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) experimental model of Parkinson disease,<sup>89</sup> and highly downregulated in laser microdissected dopaminergic neurons (DA) of the *SNpc* of Parkinson disease patients.<sup>90</sup> The latter observation might indicate a need for a decreased autophagic activity, by means of the degradation of *GABARAPL1* and/or other autophagy proteins, in order for these neurodegenerative diseases to progress, further suggesting the importance of GABARAPL1 in the prevention of neurodegenerative diseases.

It is worth noting that sex steroids, in particular estrogens, have a protective effect in various models of brain injury and, in particular, in a MPTP-murine model of Parkinson disease.<sup>91</sup> Since estrogens regulate *GABARAPL1* transcription, the GABARAPL1 protein may be one of the links between estrogen

**Table 1.** List of confirmed GABARAPL1-interacting partners

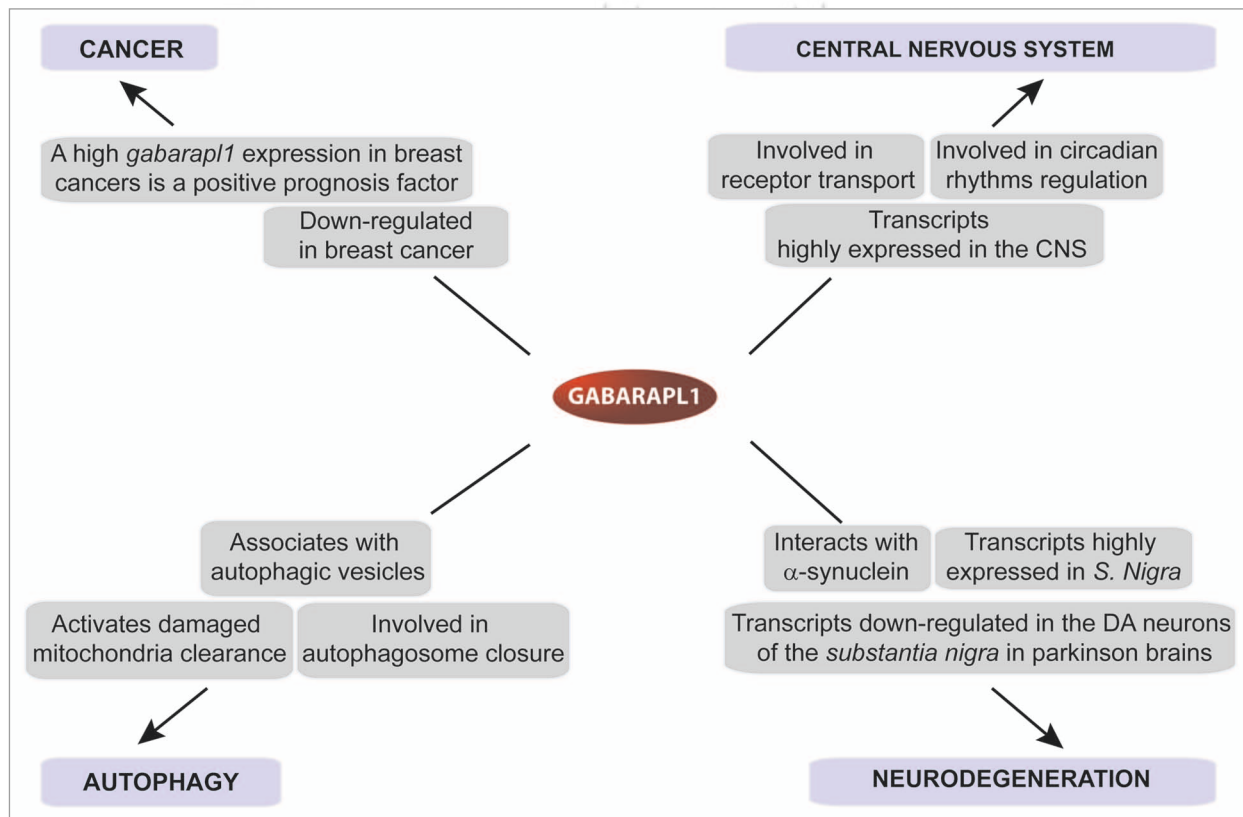
GABARAPL1-interacting partners	Potential significance of the interaction	References
<i>GABARAPL1-specific partners</i>		
<b>ARH (Autosomal recessive hypercholesterolemia)</b>	Intracellular transport, outgrowth and elongation of axons	Mameza <i>et al.</i> , 2007
<b><math>\alpha</math>-synuclein</b>	Protein aggregates degradation in neurodegenerative diseases	Schnack <i>et al.</i> , 2008
<i>Partners common with one or more GABARAP-family members</i>		
<b>GABA<sub>A</sub>R (Gamma-aminobutyric acid type A receptor)</b>	Transport of the GABA <sub>A</sub> receptor to plasma membranes	Mansuy <i>et al.</i> , 2004
<b>Tubulin</b>	Tubulin assembly, microtubules bundling, transport of GABA <sub>A</sub> receptor <i>via</i> microtubules	Mansuy <i>et al.</i> , 2004
<b>KOR (Kappa opioid receptor)</b>	Transport of KOR from ER/Golgi to plasma membranes	Chen <i>et al.</i> , 2006
<b>NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor)</b>	Intracellular transport, membrane fusion events	Chen <i>et al.</i> , 2006
<b>PX-RICS</b>	Transport of the N-cadherin/ $\beta$ -catenin complex from ER to Golgi	Nakamura <i>et al.</i> , 2008
<b>Stbd1 (Starch binding domain containing protein 1/genethonin 1)</b>	Vesicular transfer of glycogen to the lysosome	Jiang <i>et al.</i> , 2010
<b>p62/SQSTM1 (sequestosome 1)</b>	Degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy	Rual <i>et al.</i> , 2005; Pankiv <i>et al.</i> , 2007
<b>Nbr1 (Neighbor of Brca1)</b>	Degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy	Larsen <i>et al.</i> , 2010
<b>Nix</b>	Clearance of damaged mitochondria by mitophagy	Novak <i>et al.</i> , 2010

and neuroprotection. If this is indeed the case, it might constitute an attractive therapeutic target in the future.

### Other Functions of GABARAPL1

*GABARAPL1* mRNA expression is upregulated in peripheral blood mononuclear cells from chronic fatigue syndrome

patients compared with normal blood donors.<sup>92</sup> GABARAPL1 is the only member of the GABARAP family that has been shown to interact with the autosomal recessive hypercholesterolemia protein<sup>93</sup> in the brain. Lastly, GABARAPL1 interacts with the starch binding domain-containing protein 1, a protein thought to play a role in glycogen metabolism (Table 1).<sup>94,95</sup>



**Figure 4.** Confirmed and putative roles of GABARAPL1. Schematic illustration of described or putative roles for GABARAPL1 and regulation of *Gab-arapl1* gene and GABARAPL1 protein in physiological processes or pathologies.



## Conclusion

GABARAPL1, like GABARAP, is implicated in several different cellular processes and presents a specific regulation including the estrogen hormones, the FOXO family and the circadian rhythms. Moreover, it is differentially regulated in various pathologies, such as breast cancer, colorectal cancer, neurodegenerative models and chronic fatigue syndrome (Fig. 4).

Together, these data suggest an essential and specific role for this protein that is distinct from that of its closest homolog, GABARAP. At the molecular and cellular levels, the main question to address will be the specificity of their protein partners: are they identical for all the members of the family or are they specific to different pathologies? The necessary studies to answer these questions, however, will require a specific antibody to further characterize the interaction of GABARAPL1 with its protein partners. The therapeutic potential of GABARAPL1 looks promising since this protein displays a specific regulation that is

not shared by the other members of the GABARAP family. In particular, GABARAPL1 might prove a useful therapeutic target for estrogen responsive cancers and in neurodegenerative diseases. The example of GABARAPL1 demonstrates the importance to differentiate between the different members of the GABARAP family when studying their role and no longer consider these proteins as being functionally redundant.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Inter Régionale Grand Est), Comité du Doubs. Fatima Zahra Chakrama and Jaclyn Nicole Le Grand are supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and Stéphanie Seguin is supported by a fellowship from Région de Franche-Comté/Cancéropôle Grand-Est. Authors are grateful to Dr. Petra Gross for critically reading the manuscript and for editorial suggestions.

## References

- Pellerin I, Vuillemoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, Adessi GL. Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993; 90:17-21; PMID: 8495796; DOI:10.1016/0303-7207(93)90161-C.
- Jouvenot M, Pellerin I, Alkhalaf M, Marechal G, Royez M, Adessi GL. Effects of 17beta-estradiol and growth factors on c-fos gene expression in endometrial epithelial cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 72:149-57; PMID: 2127027; DOI:10.1016/0303-7207(90)90139-Y.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein links GABA<sub>A</sub> receptors and the cytoskeleton. *Nature* 1999; 397:69-72; PMID: 9892355; DOI:10.1038/16264.
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, et al. A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:118-25; PMID: 11374880; DOI:10.1006/bbrc.2001.4908.
- Sagiv Y, Legesse-Miller A, Porat A, Elazar Z. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J* 2000; 19:1494-504; PMID: 10747018; DOI:10.1093/emboj/19.7.1494.
- Paz Y, Elazar Z, Fass D. Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Atg7p. *J Biol Chem* 2000; 275:25445-50; PMID: 10856287; DOI:10.1074/jbc.C000307200.
- Xin Y, Yu L, Chen Z, Zheng L, Fu Q, Jiang J, et al. Cloning, expression patterns and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein. *Genomics* 2001; 74:408-13; PMID: 11414770; DOI:10.1006/geno.2001.6555.
- Mann SS, Hammarback JA. Gene localization and developmental expression of light chain 3: a common subunit of microtubule-associated protein 1A(MAP1A) and MAP1B. *J Neurosci Res* 1996; 43:535-44; PMID: 8833088; DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960301)43:5<535::AID-JNR3>3.0.CO;2-J.
- Mann SS, Hammarback JA. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J Biol Chem* 1994; 269:11492-7; PMID: 7908909.
- Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8; PMID: 11060023; DOI:10.1093/emboj/19.21.5720.
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:1-11; PMID: 20431342; DOI:10.4161/auto.6.4.11819.
- Tanida I, Sou YS, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3. *FEBS J* 2006; 273:2553-62; PMID: 16704426; DOI:10.1111/j.1742-4658.2006.05260.x.
- Knight D, Harris R, McAlister MS, Phelan JP, Geddes S, Moss SJ, et al. The X-ray crystal structure and putative ligand-derived peptide binding properties of gamma-aminobutyric acid receptor type A receptor-associated protein. *J Biol Chem* 2002; 277:5556-61; PMID: 11729197; DOI:10.1074/jbc.M109753200.
- Bavro VN, Sola M, Bracher A, Kneussel M, Betz H, Weissenhorn W. Crystal structure of the GABA<sub>A</sub>-receptor-associated protein, GABARAP. *EMBO Rep* 2002; 3:183-9; PMID: 11818336; DOI:10.1093/embo-reports/kvf026.
- Coyle JE, Qamar S, Rajashankar KR, Nikolov DB. Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA<sub>A</sub> receptor localization and tubulin binding. *Neuron* 2002; 33:63-74; PMID: 11779480; DOI:10.1016/S0896-6273(01)00558-X.
- Stangler T, Mayr LM, Willbold D. Solution structure of human GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein GABARAP: implications for biological function and its regulation. *J Biol Chem* 2002; 277:13363-6; PMID: 11875056; DOI:10.1074/jbc.C200050200.
- Kouno T, Miura K, Kanematsu T, Shirakawa M, Hirata M, Kawano K. 1H, 13C and 15N resonance assignments of GABARAP, GABA<sub>A</sub> receptor associated protein. *J Biomol NMR* 2002; 22:97-8; PMID: 11885988; DOI:10.1023/A:1013884402033.
- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F. The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells* 2004; 9:611-8; PMID: 15265004; DOI:10.1111/j.1356-9597.2004.00750.x.
- Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Expression of *gec1/GABARAPL1* versus GABARAP mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 119:216-9; PMID: 14625090; DOI:10.1016/j.molbrainres.2003.09.011.
- Kusama Y, Sato K, Kimura N, Mitamura J, Ohdaira H, Yoshida K. Comprehensive analysis of expression pattern and promoter regulation of human autophagy-related genes. *Apoptosis* 2009; 14:1165-75; PMID: 19657746; DOI:10.1007/s10495-009-0390-2.
- Eyigor O, Lin W, Jennes L. Identification of neurones in the female rat hypothalamus that express oestrogen receptor-alpha and vesicular glutamate transporter-2. *J Neuroendocrinol* 2004; 16:26-31; PMID: 14962072; DOI:10.1111/j.1365-2826.2004.01109.x.
- Vernier-Magnin S, Nemos C, Mansuy V, Tolle F, Guichard L, Delage-Mourroux R, et al. Analysis of the guinea-pig estrogen-regulated *gec1/GABARAPL1* gene promoter and identification of a functional ERE in the first exon. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1731:23-31; PMID: 16153720; DOI:10.1016/j.bbexp.2005.05.002.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21:2933-42; PMID: 15860560; DOI:10.1093/bioinformatics/bti473.
- Frith MC, Hansen U, Weng Z. Detection of cis-element clusters in higher eukaryotic DNA. *Bioinformatics* 2001; 17:878-89; PMID: 11673232; DOI:10.1093/bioinformatics/17.10.878.
- Wu-Peng XS, Pugliese TE, Dickerman HW, Pentecost BT. Delineation of sites mediating estrogen regulation of the rat creatine kinase B gene. *Mol Endocrinol* 1992; 6:231-40; PMID: 1569966; DOI:10.1210/me.6.2.231.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74:311-7; PMID: 11162939; DOI:10.1016/S0960-0760(00)00108-4.
- Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. Specific distribution of *gabarap*, *gec1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 2006; 1073:83-7; PMID: 16458273; DOI:10.1016/j.brainres.2005.11.004.

28. Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guitaut M, Fraichard A, et al. Specific regional distribution of *gac1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2008; 1210:103-15; PMID: 18423580; DOI:10.1016/j.brainres.2008.02.077.
29. Malyala A, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes. *Steroids* 2005; 70:397-406; PMID: 15862823; DOI:10.1016/j.steroids.2005.03.004.
30. Mansuy V, Risold PY, Glauser M, Fraichard A, Pralong FP. Expression of the GABA<sub>A</sub> receptor associated protein *Gec1* is circadian and dependent upon the cellular clock machinery in GnRH secreting GnV-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 307:68-76; PMID: 19524128; DOI:10.1016/j.mce.2009.02.029.
31. Chu Z, Moenter SM. Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors modulates GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons and alters their firing rate: a possible local feedback circuit. *J Neurosci* 2005; 25:5740-9; PMID: 15958740; DOI:10.1523/JNEUROSCI.0913-05.2005.
32. Leranthe C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanbrough M, Naftolin F. Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 1985; 40:536-9; PMID: 3892354; DOI:10.1159/000124127.
33. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935-41; PMID: 12198538; DOI:10.1038/nature00965.
34. Ripperger JA, Schibler U. Circadian regulation of gene expression in animals. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13:357-62; PMID: 11343908; DOI:10.1016/S0955-0674(00)00220-9.
35. Sakao E, Ishihara A, Horikawa K, Akiyama M, Arai M, Kato M, et al. Two-peaked synchronization in day/night expression rhythms of the fibrinogen gene cluster in the mouse liver. *J Biol Chem* 2003; 278:30450-7; PMID: 12750384; DOI:10.1074/jbc.M304809200.
36. Sachdeva UM, Thompson CB. Diurnal rhythms of autophagy: implications for cell biology and human disease. *Autophagy* 2008; 4:581-9; PMID: 18437053.
37. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002; 109:307-20; PMID: 12015981; DOI:10.1016/S0092-8674(02)00722-5.
38. Sengupta A, Molkenkin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2009; 284:28319-31; PMID: 19696026; DOI:10.1074/jbc.M109.024406.
39. Sengupta A, Molkenkin JD, Paik JH, Depinho RA, Yutzey KE. FoxO Transcription Factors Promote Cardiomyocyte Survival upon Induction of Oxidative Stress. *J Biol Chem* 2011; 286:7468-78; PMID: 21159781; DOI:10.1074/jbc.M110.179242.
40. Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* 2009; 284:31484-92; PMID: 19758991; DOI:10.1074/jbc.M109.033936.
41. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 2007; 6:458-71; PMID: 18054315; DOI:10.1016/j.cmet.2007.11.001.
42. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004; 18:39-51; PMID: 14718385; DOI:10.1096/fj.03-0610.com.
43. Chiacchiera F, Simone C. Inhibition of p38alpha unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. *Autophagy* 2009; 5:1030-3; PMID: 19587525; DOI:10.4161/auto.5.7.9252.
44. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 2007; 6:472-83; PMID: 18054316; DOI:10.1016/j.cmet.2007.11.004.
45. Chen C, Li JG, Chen Y, Huang P, Wang Y, Liu-Chen LY. GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:7983-93; PMID: 16431922; DOI:10.1074/jbc.M509805200.
46. Wang Y, Dun SL, Huang P, Chen C, Chen Y, Unterwald EM, et al. Distribution and ultrastructural localization of GEC1 in the rat CNS. *Neuroscience* 2006; 140:1265-76; PMID: 16650615; DOI:10.1016/j.neuroscience.2006.03.013.
47. Kassiotis C, Ballal K, Wellnitz K, Vela D, Gong M, Salazar R, et al. Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading. *Circulation* 2009; 120:191-7; PMID: 19752367; DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.842252.
48. Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despoughey G, et al. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010; 6:495-505; PMID: 20404487; DOI:10.4161/auto.6.4.11819.
49. Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA<sub>A</sub> receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:639-48; PMID: 15530441; DOI:10.1016/j.bbrc.2004.10.072.
50. Macdonald RL, Olsen RW. GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17:569-602; PMID: 7516126; DOI:10.1146/annurev.ne.17.030194.003033.
51. Rabow LE, Russek SJ, Farb DH. From ion currents to genomic analysis: recent advances in GABA<sub>A</sub> receptor research. *Synapse* 1995; 21:189-274; PMID: 8578436; DOI:10.1002/syn.890210302.
52. Belhage B, Hansen GH, Elster L, Schousboe A. Effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) on synaptogenesis and synaptic function. *Perspect Dev Neurobiol* 1998; 5:235-46; PMID: 9777639.
53. Chen Y, Chen C, Kotsikou E, Lynch DL, Reggio PH, Liu-Chen LY. GEC1/kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect. *J Biol Chem* 2009; 284:1673-85; PMID: 19001416; DOI:10.1074/jbc.M808303200.
54. Wang H, Olsen RW. Binding of the GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein (GABARAP) to microtubules and microfilaments suggests involvement of the cytoskeleton in GABARAP-GABA<sub>A</sub> receptor interaction. *J Neurochem* 2000; 75:644-55; PMID: 10899939; DOI:10.1046/j.1471-4159.2000.0750644.x.
55. O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H. GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *Eur J Neurosci* 2005; 22:2644-8; PMID: 16307606; DOI:10.1111/j.1460-9568.2005.04448.x.
56. Marsden KC, Beattie JB, Friedenthal J, Carroll RC. NMDA receptor activation potentiates inhibitory transmission through GABA receptor-associated protein-dependent exocytosis of GABA<sub>A</sub> receptors. *J Neurosci* 2007; 27:14326-37; PMID: 18160640; DOI:10.1523/JNEUROSCI.4433-07.2007.
57. Kittler JT, Rostaing P, Schiavo G, Fritschy JM, Olsen R, Triller A, et al. The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA<sub>A</sub> receptors. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18:13-25; PMID: 11461150; DOI:10.1006/mcne.2001.1005.
58. Chen C, Wang Y, Huang P, Liu-Chen LY. Effects of C-terminal modifications of GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor expression. *J Biol Chem* 2011; 286:15106-15; PMID: 21388957; DOI:10.1074/jbc.M111.230896.
59. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298:776-85; PMID: 20089931; DOI:10.1152/ajpcell.00507.2009.
60. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8:931-7; PMID: 17712358; DOI:10.1038/nrm2245.
61. Denuc A, Marfany G. SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem Soc Trans* 2010; 38:34-9; PMID: 20074031; DOI:10.1042/BST0380034.
62. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2503-18; PMID: 15325588; DOI:10.1016/j.biocel.2004.05.009.
63. Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP and GATE-16. *J Biol Chem* 2006; 281:3017-24; PMID: 16303767; DOI:10.1074/jbc.M505888200.
64. Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* 2009; 122:2554-66; PMID: 19549685; DOI:10.1242/jcs.046250.
65. Marino G, Fernandez AF, Cabrera S, Lundberg YW, Cabanillas R, Rodriguez F, et al. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest* 2010; 120:2331; PMID: 20577052; DOI:10.1172/JCI42601.
66. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J* 2010; 29:1792-802; PMID: 20418806; DOI:10.1038/emboj.2010.74.
67. Cann GM, Guignabert C, Ying L, Deshpande N, Bekker JM, Wang L, et al. Developmental expansion of LC3alpha and beta: absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice. *Dev Dyn* 2008; 237:187-95; PMID: 18069693; DOI:10.1002/dvdy.21392.
68. Kirkin V, Lamark T, Sou YS, Bjorkoy G, Nunn JL, Bruun JA, et al. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 2009; 33:505-16; PMID: 19250911; DOI:10.1016/j.molcel.2009.01.020.
69. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282:24131-45; PMID: 17580304; DOI:10.1074/jbc.M702824200.
70. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; 131:1149-63; PMID: 18083104; DOI:10.1016/j.cell.2007.10.035.
71. Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 1996; 271:20235-7; PMID: 8702753; DOI:10.1074/jbc.271.34.20235.
72. Larsen KB, Lamark T, Overvatn A, Harneshaug I, Johansen T, Bjorkoy G. A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1. *Autophagy* 2010; 6:784-93; PMID: 20574168; DOI:10.4161/auto.6.6.12510.
73. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 2005; 437:1173-8; PMID: 16189514; DOI:10.1038/nature04209.
74. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 2010; 11:45-51; PMID: 20010802; DOI:10.1038/embor.2009.256.

75. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2:492-501; PMID: 11433374; DOI:10.1038/35081564.
76. Mathew R, Karp CM, BeauDOIn B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137:1062-75; PMID: 19524509; DOI:10.1016/j.cell.2009.03.048.
77. Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2010; 102:1024-31; PMID: 20197771; DOI:10.1038/sj.bjc.6605568.
78. Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, et al. Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:394-400; PMID: 15695379.
79. Roberts SS, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley JP, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:4127-34; PMID: 15483022; DOI:10.1200/JCO.2004.02.032.
80. Miao Y, Zhang Y, Chen Y, Chen L, Wang F. GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatogastroenterology* 57:257-61; PMID: 20583424.
81. Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:1524-32; PMID: 19371598; DOI:10.1016/j.bbamcr.2009.01.006.
82. de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008; 34:737-49; PMID: 18722718; DOI:10.1016/j.ctrv.2008.07.001.
83. Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 2007; 3:28-31; PMID: 16969128.
84. Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett* 2010; 584:1427-35; PMID: 20035753; DOI:10.1016/j.febslet.2009.12.034.
85. Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793:1516-23; PMID: 19167434; DOI:10.1016/j.bbamcr.2008.12.013.
86. Chen S, Rehman SK, Zhang W, Wen A, Yao L, Zhang J. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806:220-9; PMID: 20637264.
87. Jaeger PA, Wyss-Coray T. All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener* 2009; 4:16; 19348680; DOI:10.1186/1750-1326-4-16.
88. Schnack C, Danzer KM, Hengerer B, Gillardon F. Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with Cdc42 effector proteins. *Neuroscience* 2008; 154:1450-7; PMID: 18541383; DOI:10.1016/j.neuroscience.2008.02.049.
89. Storvik M, Arguel MJ, Schmieder S, Delerue-Audegond A, Li Q, Qin C, et al. Genes regulated in MPTP-treated macaques and human Parkinson's disease suggest a common signature in prefrontal cortex. *Neurobiol Dis* 2010; 38:386-94; PMID: 20206263; DOI:10.1016/j.nbd.2010.02.008.
90. Simunovic F, Yi M, Wang Y, Macey L, Brown LT, Krichevsky AM, et al. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology. *Brain* 2009; 132:1795-809; PMID: 19052140; DOI:10.1093/brain/awn323.
91. Bourque M, Dluzen DE, Di Paolo T. Neuroprotective actions of sex steroids in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30:142-57; PMID: 19410597; DOI:10.1016/j.yfrne.2009.04.014.
92. Kaushik N, Fear D, Richards SC, McDermott CR, Nuwaysir EF, Kellam P, et al. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol* 2005; 58:826-32; PMID: 16049284; DOI:10.1136/jcp.2005.025718.
93. Mameza MG, Lockard JM, Zamora E, Hillefors M, Lavina ZS, Kaplan BB. Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions. *J Neurochem* 2007; 103:927-41; PMID: 17727637; DOI:10.1111/j.1471-4159.2007.04854.x.
94. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature* 2010; 466:68-76; PMID: 20562859; DOI:10.1038/nature09204.
95. Jiang S, Heller B, Tagliabracci VS, Zhai L, Irimia JM, Depaoli-Roach AA, et al. Starch binding domain containing protein 1/genethonin 1 is a novel participant in glycogen metabolism. *J Biol Chem* 2010; 285:34960-71; PMID: 20810658; DOI: 10.1074/jbc.M110.150839.

Do not distribute.

**PUBLICATION IV : GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles**

Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, **Jaclyn Nicole Le Grand**, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Gilles Despouy, Valérie Perez, Michèle Jouvenot and Michaël Boyer-Guittaut

*Autophagy* (2010) 6:4, 1-11.





# GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles

Fatima Zahra Chakrama, Stéphanie Seguin-Py, Jaclyn Nicole Le Grand, Annick Fraichard, Régis Delage-Mourroux, Gilles Despouy, Valérie Perez, Michèle Jouvenot and Michaël Boyer-Guittaut\*

Université de Franche-Comté; Laboratoire de Biochimie; EA3922 "Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central"; IFR133; U.F.R. Sciences et Techniques; Besançon, France

**Key words:** GEC1, GABARAPL1, GABARAP, LC3, autophagy, lysosome, HEK293, MCF-7

**Abbreviations:** Atg, autophagy-related genes; DMSO, dimethylsulfoxide; EBSS, earle's balanced salt solution; FBS, foetal bovine serum; GABA<sub>A</sub>,  $\gamma$ -aminobutyric acid, type A; GABARAP, GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein; GABARAPL1, GABARAPL2, GABA<sub>A</sub> receptor-protein-like 1 and 2; GATE-16, golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; GEC1, glandular epithelial cell protein 1; GFP, green fluorescent protein; HEK293, human embryonic kidney 293; MAP-LC3, microtubule-associated protein light chain 3; MCF-7, michigan cancer foundation-7; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; NH<sub>4</sub>Cl, ammonium chloride; PBS, phosphate buffer saline; PFA, paraformaldehyde; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PVDF, polyvinylidene difluoride; SDS, sodium dodecylsulfate; SDSLB, SDS loading buffer; SDS-PAGE, SDS polyacrylamide gel electrophoresis; TEMED, N', N', N', N'-tetramethyl ethylenediamine

*Gabarapl1 (gac1)* was first described as an estrogen-regulated gene which shares a high sequence homology with the *gabarap* gene. We previously demonstrated that GABARAPL1, like GABARAP, interacts with the GABA<sub>A</sub> receptor and tubulin and promotes tubulin polymerization. Previous work has demonstrated that the GABARAP family members (GABARAP, LC3, GATE-16 and Atg8) are not only involved in the transport of proteins or vesicles but are also implicated in various mechanisms such as autophagy, cell death, cell proliferation and tumor progression. We therefore asked whether GABARAPL1 might also play a role in autophagy. First, we showed that GABARAPL1 is cleaved at glycine 116, a residue which is conserved in other members of the family. We also demonstrated that GABARAPL1 is linked to phospholipids, delipidated by Atg4B, associated with intracellular membranes and accumulated in intracellular vesicles after inhibition of lysosomal activity. Finally, we showed that GABARAPL1 partially colocalizes with LC3 or Lysotracker green in intracellular vesicles. Taken together, our results demonstrate that GABARAPL1 associates with autophagic vesicles.

## Introduction

The search for new estrogen-regulated genes in guinea pig cells performed within our laboratory resulted in the discovery of a new gene called *gac1* (*glandular epithelial cell 1*).<sup>1</sup> Later work showed that this new gene is also expressed in human cells and shares a high homology with a gene named *gabarap* (GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein).<sup>2</sup> The two proteins present an almost identical primary sequence (86% identity) and share common features such as their small size (117 amino-acids) and their ability to bind tubulin and GABA<sub>A</sub> receptors.<sup>3,4</sup> Accordingly, GEC1 was classified as a GABARAP-like protein (GABARAPL1) and was described to play a role in intracellular GABA<sub>A</sub> receptor trafficking. The GABARAP family is composed of several members which share a high identity and an almost identical three-dimensional structure.<sup>5</sup> The five identified members of this family are: GABARAP, GABARAPL1, MAP-LC3 (light chain 3 of microtubule associated protein), GATE-16 (Golgi-associated ATPase

enhancer of 16 kDa or GABARAPL2) and the yeast protein Atg8 (Autophagy-related protein 8).

Members of the GABARAP family have been studied mainly for their implication in protein and vesicle intracellular transport due to their reported interaction with the cytoskeleton. It has also been established, however, that GABARAP is involved in cell proliferation, programmed cell death and tumorigenesis<sup>6-8</sup> and that Atg8, GATE-16, GABARAP and MAP-LC3 (LC3) are all involved in the formation and elongation of autophagic vesicles called autophagosomes.<sup>9</sup>

Macroautophagy, hereafter referred to simply as autophagy, is a protein and organelle degradation pathway, first discovered in yeast, allowing the recycling of intracellular molecules during stress conditions such as nutrient or oxygen deprivation.<sup>10</sup> This cellular phenomenon has been described to play a major role during physiological processes such as neurodegenerative diseases, cardiomyopathies, cancer, programmed cell death and bacterial and viral infections.<sup>11-13</sup> During this process, a cup-shaped

\*Correspondence to: Michaël Boyer-Guittaut; Email: michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr  
Submitted: 09/26/09; Revised: 03/17/10; Accepted: 03/22/10  
Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/11819

membrane sac (pre-autophagosome) expands to engulf cytosolic components and finally closes to form an autophagosome. The autophagosome then fuses with the lysosome leading to the proteolytic degradation of its content. These two structures are characterized by different molecular markers: Atg5 modification by Atg12 is linked to the formation of pre-autophagosomes and the cleavage and covalent lipidation of LC3 is a marker of autophagosomes.<sup>14</sup>

During autophagy, the covalent link between phospholipids and effector proteins occurs through a process similar to that described for Ubiquitin and SUMO-1 (Small Ubiquitin-like Modifier 1).<sup>15</sup> This mechanism and the enzymes involved were first described in yeast but homologous proteins have since been identified in mammals.<sup>16</sup> First, one or several amino acids at the C-terminal end of the precursor protein are cleaved, thanks to a maturation enzyme (Atg4 family), to free a glycine residue (Gly120 in LC3,<sup>17</sup> or Gly116 in GATE-16 and GABARAP<sup>18</sup>). This first step leads to the mature form of the protein, denoted by the suffix “-I”. The mature protein is then transferred onto phospholipids via the intervention of an activating enzyme (E1-like, Atg7)<sup>19</sup> and a conjugating enzyme (E2-like, Atg3)<sup>20</sup> to yield the phospholipid-linked protein, denoted by the suffix “-II”. This process is cyclic since the effectors can be released thanks to a delipidating enzyme (Atg4 family) which breaks the covalent bond between the protein and the lipid.<sup>21</sup> Since GABARAPL1 shares a high homology with the GABARAP family members and the glycine 116 residue, essential for the autophagic process, is conserved in this protein, we asked whether GABARAPL1 might be implicated in the autophagic process as well.

Here we report data demonstrating that GABARAPL1 is cleaved at glycine 116 in the cell types tested and is only detectable as the processed mature form of the protein (-I). We also show that GABARAPL1 is linked onto phospholipids to generate a modified form of the protein (-II) and demonstrate that it associates with autophagosomes or lysosomes in the cells. Therefore, our work describes, for the first time, the implication of GABARAPL1 in autophagy.

## Results

**GABARAPL1 is cleaved in cells at the glycine 116 residue to produce a mature form of the protein.** Since it has been previously reported that some effectors of autophagy such as LC3, GATE-16 and GABARAP undergo a necessary maturation step before their involvement in the autophagic process and that GABARAPL1 shares a high identity with these proteins, we hypothesized that GABARAPL1 may also undergo cleavage to free the glycine 116 (Gly116) and produce the mature form of the protein, GABARAPL1-I.

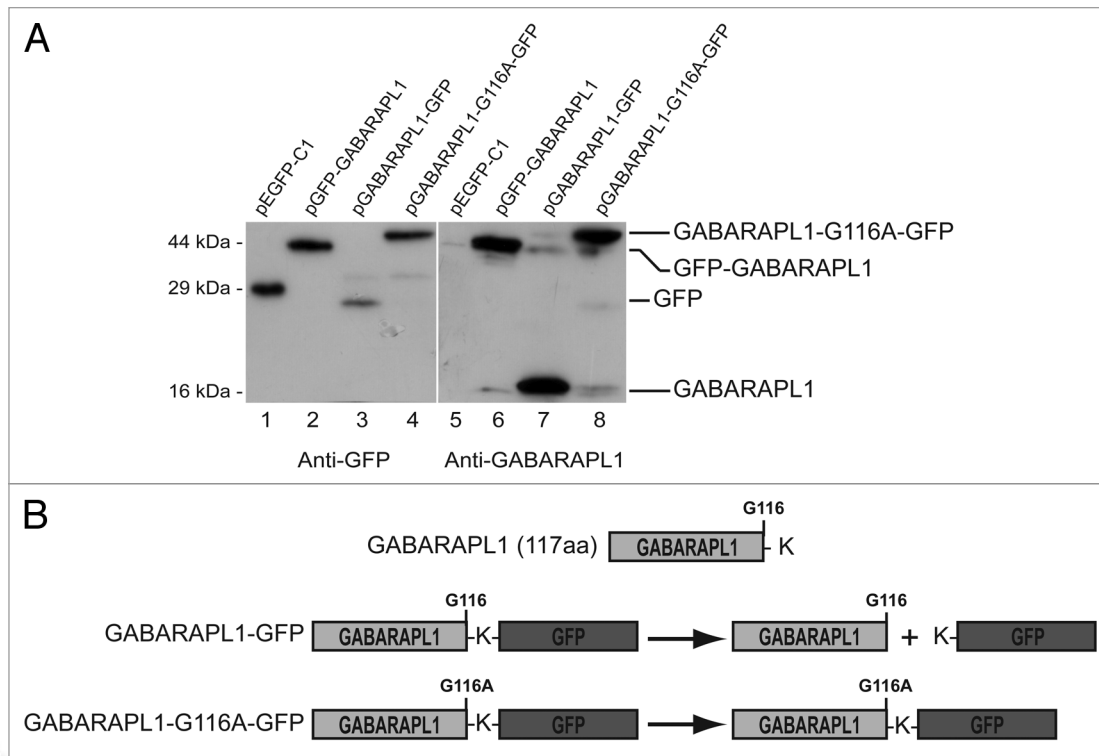
To do so, we designed two different vectors encoding GFP fused to the N-terminus of GABARAPL1 (GFP-GABARAPL1) or the C-terminus of GABARAPL1 (GABARAPL1-GFP). When these proteins were expressed in HEK293 cells, we detected the GFP-GABARAPL1 protein at the expected size of 44 kDa using either the GFP or GABARAPL1 antibody (Fig. 1A, lanes 2 and 6). However when the GABARAPL1-GFP protein was expressed

in the cells and the corresponding lysate probed with the anti-GFP antibody, we observed only one signal, corresponding to the truncated GFP protein, below the 29 kDa marker (Fig. 1A, lane 3). The difference in size between the native GFP, 29 kDa in size (lane 1), and the cleaved GFP (lane 3) was due to the presence of a supplementary linker sequence present in the pEGFP-C1 commercial vector. We confirmed these results by probing with the anti-GABARAPL1 antibody which produced only one signal at 16 kDa (Fig. 1A, lane 7). These data demonstrate that the GABARAPL1-GFP protein is cleaved in the cells into two peptides, GFP and GABARAPL1. To investigate whether the glycine 116 was the site of cleavage in GABARAPL1, we created a vector encoding the GABARAPL1-G116A-GFP protein, a mutant protein in which the Gly116 is replaced by an alanine (Fig. 1B). This mutation has previously been shown to inhibit the cleavage of autophagic effectors of the GABARAP family including GABARAP and LC3.<sup>17,29</sup> When the GABARAPL1-G116A-GFP protein was expressed in HEK293 cells, we detected a signal at the expected size of 44 kDa, corresponding to the fusion protein (Fig. 1A, lanes 4 and 8). These results demonstrate that a single point mutation (G116A) inhibits the cleavage of the GABARAPL1 protein in the cells.

**GABARAPL1 is modified during the autophagic process.** Previous work reported that several autophagic effectors (LC3, GABARAP, GATE-16) are linked to phospholipids during the course of autophagy to lead to a modified form of these factors, denoted by the suffix “-II”.<sup>18</sup> This modification status is easily detected by western blotting since the modified phospholipid-linked protein migrates faster than the mature form on SDS-PAGE. To assess if GABARAPL1 is linked to phospholipids in the cells and exists as the modified protein GABARAPL1-II, we used a HEK293 stable cell line expressing the GABARAPL1 protein fused to the Flag epitope at its N-terminus and six histidine residues at its C-terminus, Flag:GABARAPL1:6 his.

To enrich and detect the modified form of Flag:GABARAPL1:6 his (Flag:GABARAPL1-II), we induced and/or blocked the autophagic flux by using different chemical compounds: either inhibitors of lysosomal activity [Bafilomycin A1, a specific inhibitor of the vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) or NH<sub>4</sub>Cl, a V-ATPase-independent neutralizer of lysosomal pH],<sup>30</sup> inhibitors of lysosomal enzyme activity (E64d and PepstatinA, calpain and cathepsins B, D and E inhibitors)<sup>26</sup> or inducers of autophagy (Rapamycin, an inhibitor of the mTOR kinase and EBSS, a starvation medium).<sup>31</sup> By inducing and/or blocking the autophagic pathway, we expected to observe an accumulation of autophagosomes and therefore an increase in the levels of the Flag:GABARAPL1-II form of the protein.

When untreated HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cell lysates were probed with an antibody against GABARAPL1, we detected two signals at 16 and 19 kDa (Fig. 2A and B, lanes 1), corresponding to the mature GABARAP-I and GABARAPL1-I proteins. This can be explained by the fact that no commercial or homemade antibody which we have tested so far has been able to differentiate between the two homologous proteins.<sup>3,32</sup> Moreover, previous transient transfection experiments using GABARAP and GABARAPL1-expressing vectors showed that



**Figure 1.** GABARAPL1 is cleaved in cells at the glycine 116 residue to produce a mature form of the protein. (A) HEK293 cells were transfected with the pEGFP-C1, pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pGABARAPL1-G116A-GFP, vectors. After 48 h, cells were lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE and immunoblotted using anti-GFP or anti-GABARAPL1 antibodies and the ECL Plus reagent. Vertical lines have been inserted to indicate repositioned lanes. A representative experiment of 5 performed is shown. (B) Schema representing the GABARAPL1-GFP and GABARAPL1-G116A-GFP fusion proteins and the peptides formed after their expression and maturation in cells.

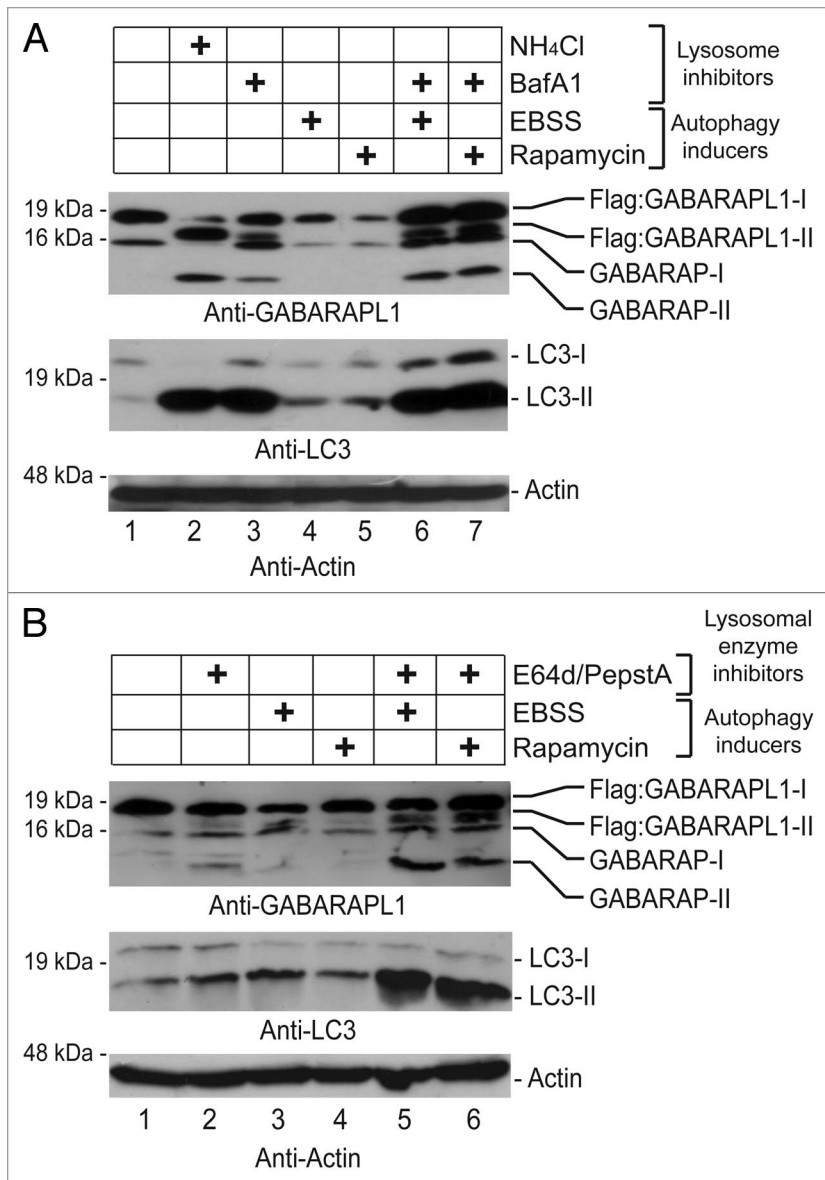
GABARAP migrates as a 16 kDa protein and GABARAPL1 as a 19 kDa protein on SDS-PAGE (data not shown). GABARAP was therefore used in our assays as an internal control to follow the behavior of a previously described autophagy effector.<sup>33</sup> HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were then cultured in the presence of lysosome or lysosomal enzyme inhibitors ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA),<sup>27,34</sup> or autophagy inducers (EBSS or Rapamycin) or combinations of both. The GABARAPL1 protein was then detected in the cell lysates by immunoblotting (Fig. 2A and B). In HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells treated with lysosomal activity inhibitors alone ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA), we detected the apparition of two new signals, migrating faster than the unmodified proteins, which corresponded to modified forms of GABARAP (GABARAP-II) and GABARAPL1 (GABARAPL1-II) (Fig. 2A, lanes 2 and 3 and B, lane 2). After treatment of HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells with autophagy inducers (EBSS and Rapamycin), we observed no increase in the amount of the forms -II in the cells (Fig. 2A, lanes 4 and 5 and B, lanes 3 and 4). However, when we incubated the HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells with a combination of autophagy inducers and lysosomal activity inhibitors, we observed a stronger increase in the amount of forms -II of both proteins compared to the inducers or inhibitors alone (Fig. 2A, lanes 6 and 7 and B, lanes 5 and 6). Moreover, we observed that, in our model, the behavior of GABARAPL1 was similar to the previously described behavior of known autophagy

actors such as GABARAP and LC3 (Fig. 2A and B) except that the ratio LC3-II/LC3-I was always higher than the ratio GABARAPL1-II/GABARAPL1-I. All together, these results demonstrate that GABARAPL1 is modified in the cells during the autophagic process and that the amount of the modified form -II is regulated by autophagy inducers and lysosomal degradation inhibitors.

**Atg4B delipidates GABARAPL1 in the cells.** The cellular autophagic process is a cyclic mechanism and the proteins involved in this pathway are recycled for later rounds. In particular, the proteins linked to the phospholipids which form the autophagosomes can be reused if they are not degraded in the lysosome. To be recycled, these proteins need to be released from the lipids via the intervention of an autophagy-related cysteine protease (Atg4). Several of these enzymes have been described in mammals but one in particular has been described to be involved in the maturation and the recycling of the GABARAP family members: Atg4B.<sup>21</sup>

To assess whether Atg4B was also involved in the recycling of the GABARAPL1 protein and investigate the nature of the modification, we transiently transfected an Atg4B-expressing vector in HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells. Afterwards, we used an anti-GABARAPL1 antibody to detect the GABARAPL1 protein and its modified forms in cell extracts. As shown in Figure 3 (lanes 1, 2 and 3), the cells which did not overexpress the Atg4B protein displayed similar results to the ones previously

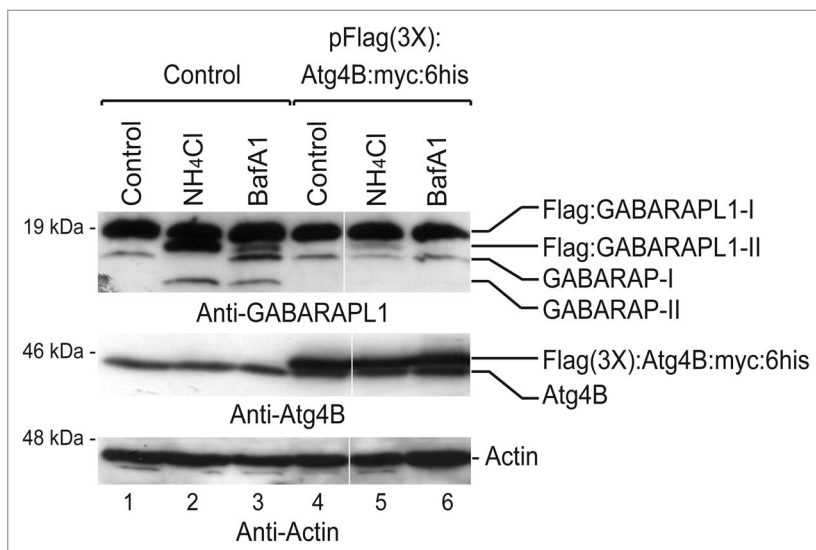




**Figure 2.** GABARAPL1 is conjugated to phospholipids in the cells. HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were cultured in the presence or absence of autophagy inducers (10  $\mu$ M Rapamycin or EBSS for 4 h) with or without (A) a lysosome inhibitor (200 nM Bafilomycin A1 for 16 h) or (B) lysosomal enzyme inhibitors (10  $\mu$ g/ml E64d/PepstatinA). Incubation with an inhibitor of lysosomal acidity (50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 2 h) was used as a positive control in the (A). Cells were then lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GABARAPL1, anti-LC3 and anti-Actin antibodies and the ECL Plus reagent. A representative experiment of five performed is shown.

described in the **Figure 2**. On the contrary, when the Atg4B protein was overexpressed in these cells, we detected an important decrease in the amount of the Flag:GABARAPL1-II form of the protein in the cells treated with NH<sub>4</sub>Cl and Bafilomycin A1 (**Fig. 3**, lanes 5 and 6) compared to the levels observed in the cells which do not overexpress Atg4B (**Fig. 3**, lanes 2 and 3). We also observed that the levels of GABARAP-II were decreased after Atg4B overexpression. The latter data demonstrate that the autophagy-related cysteine protease Atg4B delipidates the GABARAPL1 protein to allow its further recycling and confirm that GABARAPL1 is linked onto phospholipids in the cells.

The GABARAPL1-II form is associated with membranes in the cells. To determine whether the lipidated form of GABARAPL1 (GABARAPL1-II) is associated with intracellular membranes, we used a cell fractionation protocol to separate the membrane and soluble fractions of the cells.<sup>28</sup> This protocol was applied to HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells grown in complete medium or DMEM supplemented with 1% SVF and NH<sub>4</sub>Cl for 2 h. Cell homogenates (Whole Cell Lysates, WCL) were then centrifuged at 100,000 g and the resulting supernatant and pellet were analyzed by immunoblotting using GABARAPL1 and Transferrin receptor (CD71) antibodies. The Transferrin receptor was used as a control for cell fractionation as it has been previously described to be associated with the intracellular membrane

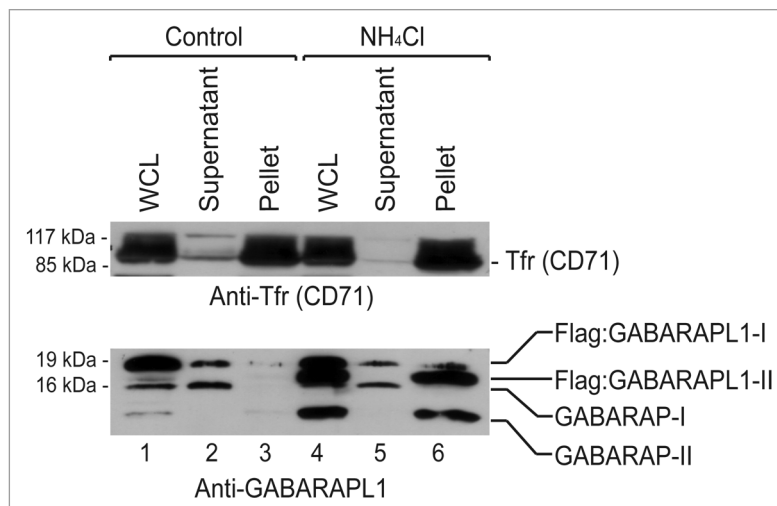


**Figure 3.** Atg4B delipidates GABARAPL1 in the cells. HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were transfected with a control (pcDNA3.1) or an Atg4B-expressing vector (pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:MyC:6 his). 48 h after transfection, cells were cultured in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 2 h or 500 nM Bafilomycin A1 for 24 h. Cells were then lysed and total proteins were separated on 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GABARAPL1, anti-Actin and anti-Atg4B antibodies and detection with the ECL Plus reagent. Vertical lines have been inserted to indicate repositioned lanes. A representative experiment of three performed is shown.

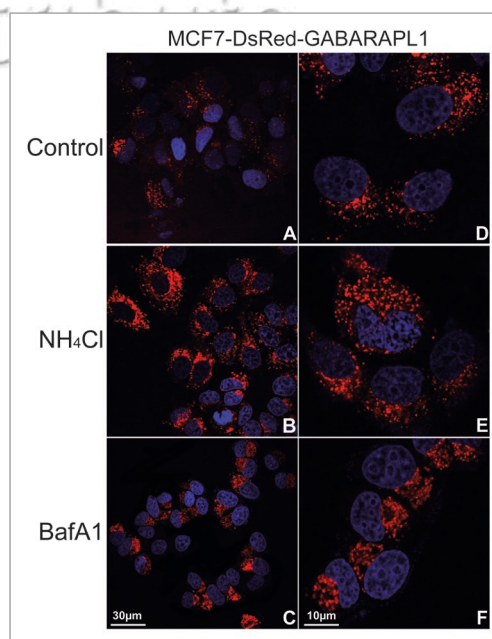
fraction.<sup>28</sup> Our results showed that  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induced the apparition of the GABARAP-II and GABARAPL1-II forms in the cells (Fig. 4, lane 4, WCL) as described above (Fig. 2). Following cell fractionation, the mature proteins (-I) were predominantly detected in the supernatants of the untreated and treated cells (Fig. 4, lanes 2 and 5). Conversely, the lipidated forms (-II) were enriched in the pellet (membranous fraction) of the induced cells (Fig. 4, lane 6). No form -II was detected in the pellet obtained from the untreated cells (Fig. 4, lane 3). Moreover, the Transferrin receptor was detected predominantly in the pellets demonstrating the specific enrichment of membranes in these fractions. All together, our results show that the GABARAPL1-II form is associated with intracellular membranes in the cells.

**Inhibition of lysosomal activity results in the accumulation of GABARAPL1-positive intracytoplasmic vesicles.** Thus far, we have shown that GABARAPL1 is modified in the cells, is delipidated by Atg4B, and that the modified form is enriched in intracellular membrane fractions. To confirm that GABARAPL1 is in fact associated with autophagosomes, we investigated the intracellular distribution of this protein after the inhibition of the autophagic flux. Indeed, we already know that proteins linked to autophagic vesicles display a punctate cytoplasmic distribution, corresponding to their localization into autophagosomes.<sup>23</sup> As such, we first designed a MCF-7 stable cell line expressing the DsRed-GABARAPL1 protein, then we inhibited lysosomal activity in these cells. In the untreated DsRed-GABARAPL1 cell lines, the fusion protein was detected in punctate locations throughout the cytosol (Fig. 5A and D). When the MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells were treated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fig. 5B and E), we detected a slight increase in the number of intracellular DsRed-GABARAPL1-positive vesicles. When the DsRed-GABARAPL1 cells were treated with Bafilomycin A1, we detected an increase in the number of GABARAPL1-positive vesicles but more strikingly, we observed a total relocalization of these vesicles in a cluster on one side of the nucleus (Fig. 5C and F). Such a pattern has been previously described for the localization of the lysosomes in the cell.<sup>30</sup> In conclusion, GABARAPL1 is localized in intracytoplasmic vesicles, a localization which is increased after treatment with lysosomal activity inhibitors.

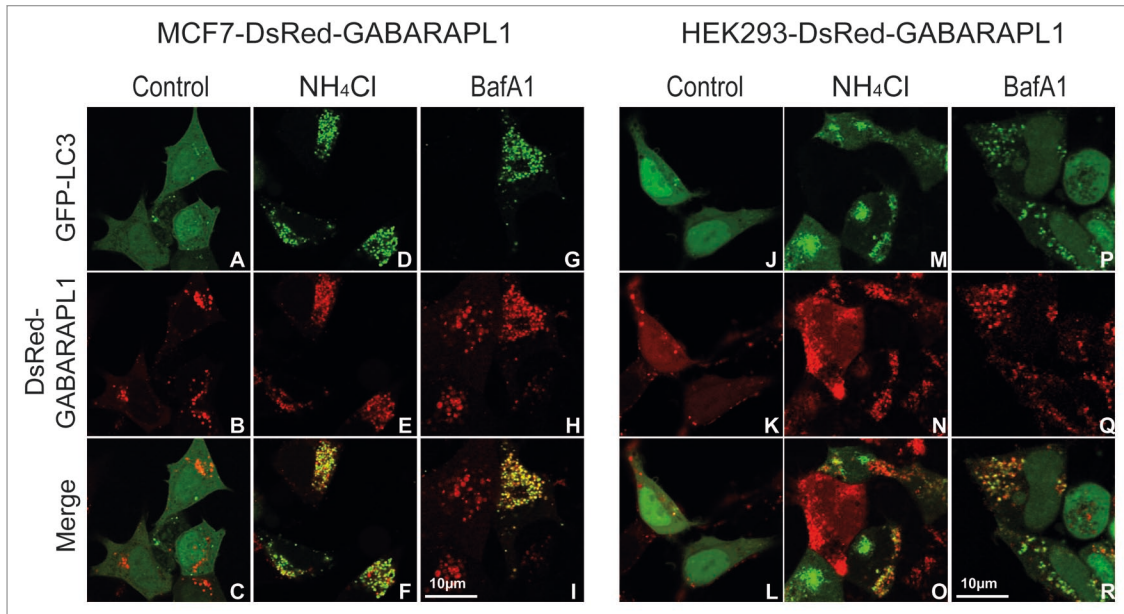
**GABARAPL1 partially colocalizes with GFP-LC3 or LysoTracker green in intracytoplasmic vesicles.** To determine the nature of the DsRed-GABARAPL1-containing vesicles, we used two different approaches: (1) we transiently overexpressed the GFP-LC3 protein in HEK293- and MCF-7-DsRed-GABARAPL1 cells and followed the intracellular localization of the two fusion proteins after treatment of the cells with lysosome inhibitors; (2) we stained the HEK293- and MCF7-Dsred-GABARAPL1 cells with a specific lysosomal marker called LysoTracker green. When we expressed the GFP-LC3 in the DsRed-GABARAPL1-expressing cell lines, we observed a diffuse localization of GFP-LC3 throughout the cytoplasm and the nucleus and some punctate



**Figure 4.** The GABARAPL1-II form is associated with membranes in the cells. HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were cultured in complete medium or DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 2 h. Cells were then collected in PBS supplemented with 1 mM PMSF, washed, homogenized (WCL, Whole Cell Lysates) and centrifuged for 10 min at 800 g. Following two ultracentrifugation rounds (30 min at 100,000 g), vesicles were resuspended in PBS (Pellet). The supernatant sample corresponds to the supernatant obtained after the first round of ultracentrifugation. One aliquot (20  $\mu\text{l}$ ) of each of the different fractions (WCL, supernatant and pellet) was separated on 15% SDS-PAGE followed by immunoblotting with anti-GABARAPL1 and anti-Transferrin receptor (Tfr, CD71) antibodies and detection with the ECL Plus reagent. A representative experiment of three performed is shown.



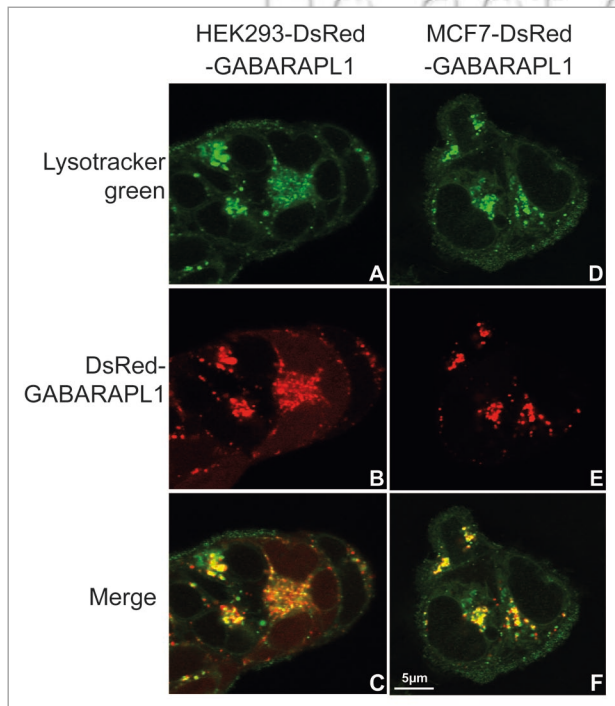
**Figure 5.** Inhibition of lysosomal activity results in the accumulation of GABARAPL1-positive intracytoplasmic vesicles. MCF-7 cells overexpressing the DsRed-GABARAPL1 protein were incubated in complete medium (Control) (A and D), DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 2 h ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (B and E) or complete medium supplemented with 500 nM of Bafilomycin A1 for 24 h (BafA1) (C and F). Cells were then fixed and analyzed by confocal microscopy. The images on the right (D-F) correspond to a 3-fold magnification of the images on the left (A-C). Representative images of three independent experiments are shown.



**Figure 6.** GABARAPL1 partially colocalizes with LC3 in the cells. MCF7- (A–I) or HEK293-DsRed-GABARAPL1 (J–R) cells were transfected with the pGFP-LC3 vector in Lab-Tek™II chambers. 48 h after transfection, cells were incubated with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 2 h (D–F, M–O) or 500 nM Baflomycin A1 for 24 h (G–I, P–R). Living cells were then analyzed by confocal microscopy. Representative images of three independent experiments are shown.

structures in the cytosol. Regarding DsRed-GABARAPL1, the protein was localized in intracytoplasmic dots in MCF-7 and presented a diffuse localization with few punctate structures in

HEK293. When we treated the cells with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  or Baflomycin A1 (Fig. 6D, G, M and P), we observed an almost complete relocation of GFP-LC3 into intracytoplasmic vesicles in the two cell lines and an increase in DsRed-GABARAPL1 punctate structures but only part of those GABARAPL1-positive vesicles were LC3-positive as well (F, I, O and R). Since we observed a high heterogeneity of staining between cell lines and between cells from the same culture, we were unable to establish a significant count of the number of vesicles carrying both LC3 and GABARAPL1. Nevertheless, we can affirm that not all vesicles are carrying both proteins. From preliminary counts, we could conclude that approximately 50–70% of vesicles in the MCF-7 cells are double-stained and about 30–50% in the HEK293 cells. Since LC3 has been described to be an autophagosome marker, we concluded that GABARAPL1 was partially located in autophagosomes. Following staining of the HEK293- or MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells with Lysotracker green, we observed that numerous but not all DsRed-GABARAPL1-positive vesicles were stained with Lysotracker green (Fig. 7C and G). All together, these two experiments demonstrate that GABARAPL1 can be localized in LC3-containing or Lysotracker green-stained intracellular vesicles. These results confirm that GABARAPL1 is associated with autophagic vesicles.



**Figure 7.** GABARAPL1 is partially localized in lysosomes in the cells. HEK293- (A–C) or MCF7-DsRed-GABARAPL1 (D–F) cells were grown in Lab-Tek™II chambers for 24 h. Cells were then incubated in complete medium supplemented with 50 nM Lysotracker green for 1 h and living cells were analyzed by confocal microscopy. Representative images of three independent experiments are shown.

**Intracellular punctate GABARAPL1 staining is abolished in *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF.** Previous publications raised some concern about the tendency of the DsRed protein to form aggregates in the cells, structures which could be mistaken for intracellular vesicles, resulting in misleading conclusions.<sup>35</sup> To examine whether the punctate localization of GABARAPL1 in our stable cell lines was the result of DsRed aggregates or not, we transiently transfected WT and *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF cells with a DsRed-GABARAPL1-expressing vector and followed the localization



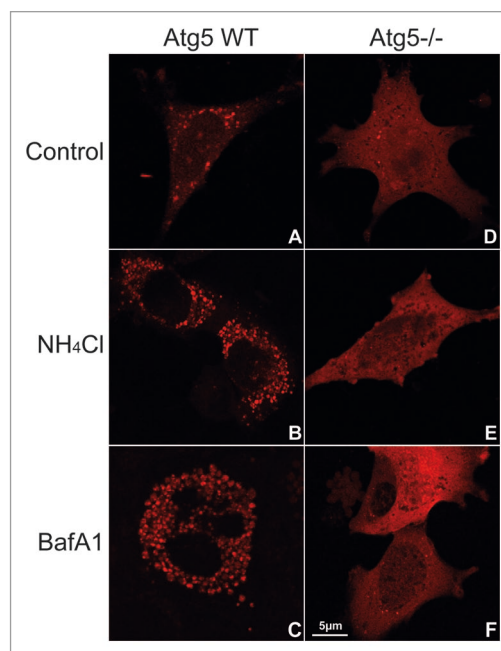
of the fusion protein before and after inhibition of lysosomal activity by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  or Bafilomycin A1 (Fig. 8). Former publications showed that the deletion of Atg5 abrogated the autophagic pathway in MEF cells.<sup>24</sup> Our results demonstrated that, before treatment, the WT cells presented a high number of red vesicles whereas the Atg5<sup>-/-</sup> cells contained a very low number of these DsRed-GABARAPL1-stained vesicles. After incubation with lysosomal inhibitors, we detected an increase in the number of punctate structures in the WT cells (Fig. 8A–C), and a significantly smaller increase in the Atg5<sup>-/-</sup> cell line (Fig. 8D–F). Taken together, our results demonstrate that the deletion of Atg5, and therefore the inhibition of the autophagic process, alters the formation of DsRed-GABARAPL1-stained vesicles showing that these structures are not protein aggregates but rather related to the process of autophagy.

### Discussion

Previous work has described the involvement of different GABARAP family members in the autophagic process. Atg8, LC3, GABARAP and GATE-16 have all been shown to be linked to phospholipids and recruited to autophagosomes after induction of autophagy.<sup>23</sup> These effectors play an important role during the elongation of double-membraned structures leading to the sequestration of cytosolic constituents and to the formation of autophagosomes. After their completion, these vesicles fuse with lysosomes to induce the degradation and recycling of their contents.<sup>18</sup> To our knowledge, all the data published to date show that these proteins play a role as effectors of autophagy but not as activators. Since GABARAPL1 (GEC1) shares a high identity with GABARAP as well as other members of the family, we asked whether GABARAPL1 might be implicated in this process as well. To examine this possibility, we addressed different questions: (1) Is GABARAPL1 cleaved in the cells to free the glycine 116 residue at its C-terminal end?, (2) Is GABARAPL1 linked to phospholipids in the cells?, (3) Is GABARAPL1 delipidated by the autophagy-related cysteine protease Atg4B?, (4) Is GABARAPL1 associated with intracellular vesicles?, (5) Does GABARAPL1 relocalize to autophagosomes during the autophagic process?

First, we showed that a GABARAPL1-GFP fusion protein was cleaved to give two products, GABARAPL1 and GFP but that this cleavage was abolished when the glycine 116 residue was replaced by an alanine. These results demonstrate that GABARAPL1 is processed in the cells and that the maturation occurs at glycine 116. Moreover, it is worth noting that we were unable to detect the GABARAPL1-GFP fusion protein in our cell lysates, suggesting that this protein was cleaved following its synthesis and that this maturation step was not a consequence of autophagy induction. In addition, similar data were obtained using GABARAP wild-type and mutant-expressing vectors in HEK293 (data not shown) and these results were confirmed, for the two proteins (GABARAPL1 and GABARAP), in different cell types (COS7, MCF-7) showing that this process is not cell-type specific (data not shown).

We then asked whether GABARAPL1 was modified in the cells. To do so, we used a combination of different chemicals inducing



**Figure 8.** Intracellular punctate GABARAPL1 staining is abolished in Atg5<sup>-/-</sup> MEFs. WT (A–C) and Atg5<sup>-/-</sup> (D–F) MEF cells were transfected with a DsRed-GABARAPL1-expressing vector. 48 h after transfection, cells were incubated in complete medium (A and B), with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 2 h (B and E) or 500 nM Bafilomycin A1 for 24 h (C and F). Cells were then analyzed by confocal microscopy. Representative images of three independent experiments are shown.

the autophagic process or inhibiting the lysosomal degradation. We incubated HEK293 cells overexpressing the GABARAPL1 protein with: (1) lysosome inhibitors ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA), (2) autophagy inducers (rapamycin or EBSS), or (3) a combination of both. Subsequently, we searched for the modified form of the protein (GABARAPL1-II) in these cells. All of these treatments have been previously described to result in a significant increase in the amount of the phospholipid-linked forms of autophagy effectors such as LC3 and GABARAP. In our experiments, we effectively detected GABARAPL1-II but we observed variations in the amount of this form according to the protocol used. The highest levels were detected with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . EBSS and rapamycin did not allow the detection of the form -II without the addition of lysosomal degradation inhibitors (Bafilomycin A1 or E64d/PepstatinA). It is noteworthy that we obtained the same results with the stable MCF7-Flag:GABARAPL1:6 his cell line (data not shown). In conclusion, we show that GABARAPL1 is modified in the cells and that this modification is induced by autophagy inducers. These results are in agreement with the data obtained for the other members of the GABARAP family including GABARAP, LC3 and GATE-16.<sup>36</sup> The fact that this modification is only detected when the degradation of the forms -II are inhibited by lysosomal activity inhibitors is congruent with previously published data on LC3.<sup>26</sup> Moreover, we clearly see in our experiment that the lipidation of LC3 is weak in the presence of the autophagy inducers alone compared to the levels detected after addition of lysosome inhibitors. Therefore, it seems that, in

our model, the conjugation of autophagy effectors to phospholipids is a slower process than that of degradation.

We also observed that the levels of lipidation of the individual Atg8 family members examined are different, with LC3 presenting a higher rate of modification than the two other proteins, GABARAP and GABARAPL1. These results were similar to those obtained in the MCF-7 cell line (data not shown). Nevertheless, since the affinity of the antibodies we used may vary from one form (-I) to another (-II), we cannot quantify the respective amounts of the -I and -II forms in the cells. Indeed, Mizushima and Yoshimori previously demonstrated that a specific LC3 antibody did not recognize the phospholipid-modified protein with the same affinity than the native one.<sup>37</sup> They argued that a comparison of the ratio of conversion -I/-II between proteins, conditions or cell types would be misleading.

We know that *gabarapl1* transcripts are highly expressed in the brain and are more abundant than the *lc3* ones.<sup>38</sup> It has also previously been published that *gabarapl1*, *lc3* and *atg12* transcript expression is enhanced under cellular stress such as glucose deprivation by the FoxO transcription factors in cultured rat neonatal cardiomyocytes.<sup>39</sup> Moreover, these increases of expression correlate with an activation of the autophagic flux but the relative involvement of GABARAPL1 and LC3 in this process still has to be determined. In addition, the authors of the latter article did not demonstrate that the antibody used to detect GABARAPL1 was specific to this protein and that the signals obtained were not linked to the expression of its homologue GABARAP. At the moment, with the tools available, it is therefore impossible to determine the relative role of each of the Atg8 family members during the course of autophagy, since they are all involved in the same step of this process. One solution might be to create knockout cell lines for each of these factors and study the behavior of the mutant cells throughout the course of autophagy, particularly during the formation of autophagosomes. In conclusion, the tissue- or cell-specific expression of GABARAPL1 has still to be determined in order to study its relative involvement in autophagy as well as a comparison to the expression of the autophagic marker, LC3. These studies will, however, require a specific antibody. Nevertheless, we believe that the role of GABARAPL1 in autophagy is subtle and probably linked to a specific tissue such as the brain, where it is highly expressed, or to a specific autophagic process such as mitophagy.<sup>40</sup>

We then wondered whether the lipidation of GABARAPL1 in the cells was a reversible mechanism, as it has already been described for LC3, GABARAP and GATE-16.<sup>18</sup> To assess this question, we expressed the maturation/delipidating Atg4B enzyme in HEK293 cells overexpressing GABARAPL1 then blocked autophagosomal degradation to look for the phospholipid-linked form of GABARAPL1. Similar to the data obtained for GABARAP family members,<sup>41</sup> we observed a significant decrease of GABARAPL1-II in the cells expressing Atg4B compared to the levels present in the untransfected cells. These results demonstrate that Atg4B is able to delipidate GABARAPL1. The latter data obtained in the cellular context are congruent with those previously described *in vitro*.<sup>42</sup> In the latter publication, the authors also showed that an overexpression of Atg4B reduced

the number of intracellular GFP-GABARAPL1-positive vesicles and that a siRNA directed against Atg4B slightly diminished GABARAPL1 delipidation in the cells. However, in their experiments, the authors used a polyclonal antibody raised against the full length protein GABARAPL1 but never demonstrated the specificity of this antibody by showing that it did not recognize GABARAP. The question of the specificity of this anti-GABARAPL1 antibody would have to be addressed to draw any concrete conclusions about the identity of the protein detected in their immunofluorescence experiments.

To complement the previous results, we performed cell fractionation experiments to determine whether GABARAPL1-II is associated with intracellular membranes after inhibition of the autophagic flow. Our data presented in **Figure 4** displayed that the form -II of both GABARAP and GABARAPL1 were highly enriched in the membrane fraction compared to the levels detected in the soluble fraction. It is worth noting that these results are similar to the ones previously published for LC3.<sup>43</sup> Nevertheless, it will be necessary in the future to develop a more accurate purification protocol to separate vesicles tagged with different proteins in order to determine if the two proteins can be co-purified in the same membrane fractions or if they are present in a different set of vesicles.

We additionally investigated whether the modification of GABARAPL1 in the cells was linked to a relocalization of the protein to intracellular vesicles after autophagy blockage. To address this question, we used two different stable cell lines, HEK293 and MCF-7 overexpressing the DsRed-GABARAPL1 protein. Using these cell lines, we observed that the untreated cells presented a GABARAPL1 punctate staining and that this vesicular localization was enhanced after treatment with lysosome inhibitors demonstrating that GABARAPL1 accumulates in intracellular puncta after lysosomal inhibition. It is noteworthy that the organization of these dots was different according to the chemicals used. With  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , the puncta were localized throughout the cytoplasm whereas with Bafilomycin A1 they were concentrated in a cluster on one side of the nucleus. Such a staining pattern has already been described for lysosomes.<sup>30</sup> Further experiments will be needed to determine if the puncta accumulating with the two chemicals represent identical vesicle population or if they differ. Former publications describe that  $\text{NH}_4\text{Cl}$  action is linked to lysosomal activity whereas Bafilomycin A1 inhibits autophagosome/lysosome fusion.<sup>30</sup> These chemicals do not, therefore, target the same step in the autophagic pathway which might explain the difference in GABARAPL1 staining in the cells.

Consequently, we asked whether GABARAPL1 colocalizes with an autophagosome marker or is localized in acidic vesicles in the cells. For this purpose, we transfected HEK293- and MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells with a GFP-LC3-expressing vector and visualized the localization of the two proteins after lysosome inactivation. The data obtained showed that a majority of vesicles, but not all, were double-stained for GABARAPL1 and LC3. The fact that these two proteins do not always colocalize can be explained in four ways: (1) a difference of expression of the two proteins in the cells, (2) the difference in stability between the GFP and DsRed fluorescence in acidic vesicles,<sup>35</sup> (3) the fact that

all autophagosomes might not be carrying both proteins, or (4) that GABARAPL1 may also be associated with a different set of vesicles not involved in the autophagic pathway. To answer this question, we stained HEK293- and MCF7-DsRed-GABARAPL1 cells with a specific lysosomal marker, LysoTracker green. In this experiment, we did not use lysosomal inhibitors since LysoTracker green chemical is sensitive to pH changes. This double-staining experiment showed that the majority of GABARAPL1 colocalizes with the lysosomes but that GABARAPL1 can be also found outside of the lysosomes. All together, the latter data demonstrate that GABARAPL1 is predominantly localized in autophagosomes or lysosomes. These results are not surprising since autophagosomes fuse with lysosomes to form autophagolysosomes and induce the degradation of their contents. Since GFP fluorescence is rapidly inhibited in acidic compartments, GFP-LC3 might allow the detection of early nonacidic autophagosomes whereas LysoTracker green stains late acidic vesicles.

These data are really interesting and will lead to some follow-up experiments. Indeed, a recent publication described the interaction of LC3/GABARAP family members with the protein Nix involved in the clearance of damaged mitochondria by the autophagic pathway.<sup>40</sup> The authors showed that GABARAPL1 binds more strongly than other members of the family to Nix and that GABARAPL1 colocalizes with Nix in cells treated with a mitochondria poison. These results suggest that the clearance of damaged mitochondria may be mediated by the specific association between GABARAPL1 and Nix and therefore confer a specificity to the nonspecific autophagic process. In the near future, it will be of interest to determine whether the autophagic proteins of the LC3/GABARAP family have specific and different cellular patterns, are linked to specific autophagic vesicles or if these proteins are involved in distinct autophagic degradation processes in the cells.

One main concern regarding the use of overexpression systems or exogenous protein expression is the fact that some proteins can aggregate and therefore create intracellular punctate structures which might be mistaken for vesicles. To demonstrate that the GABARAPL1-containing dots observed in our experiments were autophagy-related, we used the MEF Atg5<sup>-/-</sup> cell line defective for the autophagic pathway.<sup>24</sup> When we expressed the DsRed-Protein in this cell line, we observed a very low number of intracellular red vesicles before or after treatment with NH<sub>4</sub>Cl or Bafilomycin A1 compared to the wild-type control cells. These results confirmed that the vesicles we observed are autophagy-related or at least that their formation requires Atg5. The low number of vesicles still detectable in the Atg5<sup>-/-</sup> cells might be due to the role of GABARAPL1 as a transport protein<sup>38</sup> but we also cannot completely rule out the idea that some aggregates are formed when using the DsRed protein as previously described.<sup>35</sup> Further experiments will be needed to assess this question.

In our study, we used transient transfection assays or designed stable cell lines overexpressing fusion proteins because we did not possess a specific anti-GABARAPL1 antibody. Indeed, all the homemade or commercial antibodies we have tested to date are not specific for GABARAPL1, as they detect the GABARAP protein as well.<sup>3,32</sup> This is not surprising since the two proteins share

86% identity at the amino-acid level. Recently published papers have used polyclonal anti-GABARAPL1 antibodies to detect the protein in immunofluorescence experiments. However, the question of specificity of these antibodies was not addressed and therefore the identity of the protein studied in these publications remains unclear.<sup>39,42</sup> Consequently, apart from western blotting experiments in which we were able to differentiate between the two homologous proteins, we opted out of using our anti-GABARAPL1 antibody for immunofluorescence experiments. The production of a specific antibody directed against the GABARAPL1 protein will be one of the next challenges before extending the study of this protein.

Using different experimental assays, we demonstrated in a multitude of ways that GABARAPL1 is implicated in the process of autophagy. Nevertheless, further experiments will be needed to explain the link between autophagy, GABARAPL1 and its function in vivo. In particular, it would be of great interest to study the relative involvement of the different members of the GABARAP family in the autophagic process. Are these proteins redundant in the cells or are they tissue specific? We know that numerous tissues co-express the GABARAP and GABARAPL1 proteins but also that some tissues express one protein rather than the other.<sup>32,38</sup> For example, *gabarapl1* transcripts are much more abundant in the brain compared to *lc3* and *gabarap*.<sup>38</sup> Given the importance of autophagy in brain damage<sup>44</sup> and neurodegenerative diseases,<sup>45</sup> it will be essential to study the function of GABARAPL1 in the brain with respect to its implication in autophagy.

## Materials and Methods

**Reagents and antibodies.** Cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The following antibodies were used: polyclonal anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore, AB15278), polyclonal anti-LC3 (Novus Biologicals, NB100-2220), polyclonal anti-GFP (Chemicon Millipore, AB3080), polyclonal anti-Transferrin receptor (CD71) (Santa Cruz, sc65882), monoclonal anti-Atg4B (Sigma, A2981) and polyclonal anti-Actin (Sigma, A5060). Bafilomycin A1 (Sigma, B1793) was prepared as a 1 mM stock in DMSO. Ammonium chloride (NH<sub>4</sub>Cl, Sigma, A0171) was prepared as a 0.5 M stock in H<sub>2</sub>O. Rapamycin (Sigma, R8781) was prepared as a 2.5 mM stock in DMSO. E64d and Pepstatin A (Sigma, E8640 and P5318) were prepared as 10 mg/ml stocks in DMSO. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

**Plasmids and site-directed mutagenesis.** The pcDNA3.1 vector (Invitrogen, V795-20) was used for control transfections. The pcDNA5-FRT vector was purchased from Invitrogen (V6010-20). The pEGFP-C1 and pEGFP-N3 plasmids were obtained from Clontech (6084-1 and 6080-1). The pGFP-LC3, and pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:Myc:6 his plasmids were kindly provided by Dr. Elazar (Weizmann Institute, Israël),<sup>22</sup> and Dr. Yoshimori (Osaka University, Japan),<sup>23</sup> respectively. The pGABARAPL1-GFP and pGFP-GABARAPL1 plasmids encoding the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) fused to the N-terminus or C-terminus of the GABARAPL1 protein were



generated by polymerase chain reaction (PCR). The reactions were performed in a 25  $\mu$ l sample volume containing 0.2  $\mu$ M of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs and 1 U of Taq polymerase (Promega, M8305). The PCR fragments were digested with the *XhoI/SacII* or *BglIII/EcoRI* restriction enzymes (Fermentas, ER0691, ER0201, ER0281 and ER0271) and sub-cloned into the pEGFP-N3 or the pEGFP-C1 vectors to produce the pGABARAPL1-GFP and the pGFP-GABARAPL1 plasmids, respectively. The point mutation (G116A) was introduced using the QuickChange Site-Directed mutagenesis system (Stratagene, 600385) to produce the pGABARAPL1-G116A-GFP vector. The Flag:GABARAPL1:6 his cDNA was digested with the *NheI/NotI* restriction enzymes (Fermentas, ER0971 and ER0591) and sub-cloned into the pcDNA5-FRT vector (Invitrogen) to produce the pcDNA5-Flag:GABARAPL1:6 his vector. Plasmid sequences and mutations were confirmed by DNA sequencing (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems). The nucleotide sequences of the different primers are available upon request.

**Cell culture and transfection.** The HEK293 and MCF-7 cells (ATCC, CRL-1573 and HTB-22), WT and Atg5<sup>-/-</sup> MEF cells (kindly provided by Dr. Mizushima)<sup>24</sup> were cultured in DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, Invitrogen, 11880) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Invitrogen, 25030-032), 100  $\mu$ g/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Invitrogen, 15140) and 10% foetal bovine serum (FBS, Invitrogen, 10270-106) in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The HEK293- and MCF7-Flag:GABARAPL1:6 his cell lines were maintained in the complete medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml Hygromycin B (PAA, P02-015). The HEK293- and MCF7-DsRed-GABARAPL1 cell lines were maintained in the complete medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml G418 (PAA, P02-012). Transient transfections were carried out using HEK293, MCF-7, WT and Atg5<sup>-/-</sup> MEF cells plated in 6-well plates (3 x 10<sup>5</sup> per well). 500 ng of pGFP-GABARAPL1, pGABARAPL1-GFP, pGABARAPL1-G116A-GFP, pGFP-LC3 or pDsRed-GABARAPL1 and 1  $\mu$ l TransFast reagent (Promega, E2431) were used per reaction according to the manufacturer's protocol. To create the stable cell lines HEK293- or MCF7-Flag:GABARAPL1:6 his, HEK293 or MCF-7 cells were plated in 10 cm-diameter culture dishes (10<sup>6</sup> per plate) and were transfected using 20  $\mu$ g pcDNA5-Flag:GABARAPL1:6 his and 40  $\mu$ l TransFast reagent per reaction, according to the manufacturer's protocol. After 48 h incubation, cells were split in two culture dishes and 400  $\mu$ g/ml Hygromycin B were added to the complete medium for the 14 following days until the appearance of antibiotic-resistant single clones. The clones were then tested for the expression of the ectopic protein by western blotting using a polyclonal anti-GABARAPL1 antibody. To create the stable HEK293- or MCF7-DsRed-GABARAPL1 cell lines, HEK293 or MCF-7 cells were transfected using 20  $\mu$ g pDsRed-GABARAPL1 and 40  $\mu$ l TransFast reagent per reaction, according to the manufacturer's protocol. 400  $\mu$ g/ml G418 were added to the complete medium to select for single clones.

**Autophagy and confocal microscopy.** For the inhibition of lysosomal activity, cells cultured on glass coverslips were incubated for either 2 h in DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM

ammonium chloride,<sup>25</sup> 4 h in complete medium supplemented with 10  $\mu$ g/ml E64d/PepstatinA<sup>26</sup> or 24 h in complete medium supplemented with 500 nM Bafilomycin A1.<sup>27</sup> For the induction of autophagy, cells were incubated for either 4 h in EBSS medium (Sigma, E3024) or 4 h in complete medium supplemented with 10  $\mu$ M Rapamycin. Treated or untreated DsRed- or GFP-expressing cells were then fixed with 2% paraformaldehyde (PFA, Sigma, P6148) in PBS for 15 min, washed thrice with PBS and analyzed using a fluorescence laser scanning confocal microscope Fluoview FV1000 (Olympus). Each picture corresponds to one example of a typical cell staining observed in six fields chosen at random. For the LysoTracker green staining, cells were grown in Lab-Tek™II chambers (Nunc, 155380) for 24 h and subsequently incubated in complete medium supplemented with 50 nM LysoTracker green (Invitrogen, L7526) for 1 h. Living cells were then analyzed by confocal microscopy as described above.

**Cell fractionation.** Cell fractionation was carried out essentially as described previously.<sup>28</sup> In brief, HEK293-Flag:GABARAPL1:6 his cells were cultured in complete medium or DMEM supplemented with 1% FBS and 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 2 h to inhibit lysosomal activity. Cells were washed, collected in 1 ml PBS containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma, 93482), homogenized by sonication (Sonic and Materials) and the large vesicles and nuclei were pelleted at 800 g for 10 min. Supernatants were centrifuged at 100,000 g for 30 min to harvest the membranes and intracellular vesicles and organelles. The pellets were resuspended in homogenization buffer, sonicated once more and subjected to a second round of ultracentrifugation. Pellets were then resuspended in 1 ml PBS and one aliquot (20  $\mu$ l) of the different fractions (Whole Cell Lysate, Supernatant of the first centrifugation and Pellet) were reserved for western blot analysis.

**Western blot analysis.** Cells were rinsed with ice-cold PBS (0.137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and lysed in a SDS-PAGE loading buffer (78 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.5% SDS, 12.5%, 6.25%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.025% bromophenol blue). Samples were sonicated for 30 s before loading (Sonic and Materials) and separated by SDS-PAGE before transfer to Immobilon-P PVDF membrane (Dutscher, 44088). The membranes were blocked with 5% skim milk in 0.1% Tween 20/TBS (199 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.36 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated with primary antibodies in antibody block buffer (0.5% skim milk in 0.1% Tween 20/TBS). The polyclonal anti-GFP, anti-GABARAPL1, anti-LC3, anti-Actin and anti-Transferrin receptor (CD71) antibodies were diluted at 1:5,000, 1:2,000, 1:2,000, 1:2,000 and 1:1,000, respectively in the antibody block buffer. Immunoreactive bands were detected using goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies (1:20,000 in antibody block buffer) (PARIS, P1291) and the ECL Plus reagent (GE Healthcare Life Sciences, RPN2132), according to the manufacturer's protocol.

#### Acknowledgements

This work was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer, Comité du Doubs. Fatima Zahra Chakrama and Jaclyn

Nicole Le Grand are supported by fellowships from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and Stéphanie Seguin is supported by a fellowship from Région de Franche-Comté/Cancéropôle Grand-Est. We thank Dr. Elazar, and Dr. Yoshimori for kindly providing the pGFP-LC3, and the

pSF1-Flag(3X):hsAtg4B:Myc:6 his vectors, respectively. We thank Dr. Mizushima for kindly providing the WT and Atg5<sup>-/-</sup> MEF cells. Authors are grateful to Sophie Launay and Fabrice Poncet for their technical help (Plateformes microscopie et séquençage, IFR133, Besançon). Special thanks to Dr. Petra Gross for editorial advice.

## References

- Pellerin S, Lafeuillade B, Wade RH, Savona C, Chambaz EM, Feige JJ. The molecular structure of corticotropin-induced secreted protein, a novel member of the thrombospondin family. *J Biol Chem* 1993; 268:18810-7.
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, et al. A novel early estrogen-regulated gene *gcl1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:118-25.
- Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick JL, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:639-48.
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ, Olsen RW. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 1999; 397:69-72.
- Mohrluder J, Schwarten M, Willbold D. Structure and potential function of gamma-aminobutyrate type A receptor-associated protein. *FEBS J* 2009; 276:4989-5005.
- Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Schernbeck S, Petersen I. Characterization of [gamma]-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:394-400.
- Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, et al. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* 2007; 14:693-702.
- Schwarten M, Mohrluder J, Ma P, Stoldt M, Thielmann Y, Stangler T, et al. Nix directly binds to GABARAP: a possible cross-talk between apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2009; 5:690-8.
- Longatti A, Tooze SA. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ* 2009; 16:956-65.
- Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 335:1-32.
- Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, Stenmark H. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Mol Oncol* 2009; 3:366-75.
- Rami A. Review: Autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009; 35:449-61.
- Orvedahl A, Levine B. Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ* 2009; 16:57-69.
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 1998; 395:395-8.
- Denuc A, Marfany G. SUMO and ubiquitin paths converge. *Biochem Soc Trans* 38:34-9.
- Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 2002; 1:11-21.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* 2004; 279:47704-10.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2503-18.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP and MAP-LC3. *J Biol Chem* 2001; 276:1701-6.
- Tanida I, Tanida-Miyake E, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* 2002; 277:13739-44.
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP and Apg8L. *J Biol Chem* 2003; 278:51841-50.
- Shvets E, Elazar Z. Autophagy-independent incorporation of GFP-LC3 into protein aggregates is dependent on its interaction with p62/SQSTM1. *Autophagy* 2008; 4:1054-6.
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 2004; 117:2805-12.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432:1032-6.
- Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 2007; 3:181-206.
- Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 2005; 1:84-91.
- Marazziti D, Di Pietro C, Golini E, Mandillo S, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP. Macroautophagy of the GPR37 orphan receptor and Parkinson disease-associated neurodegeneration. *Autophagy* 2009; 5:741-2.
- Yoshimori T, Yamagata F, Yamamoto A, Mizushima N, Kabeya Y, Nara A, et al. The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2000; 11:747-63.
- Chen ZW, Chang CS, Leil TA, Olsen RW. C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking. *J Neurosci* 2007; 27:6655-63.
- Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, Sarkar S, Korolchuk V, Kaushik S, Klionsky DJ. In search of an "autophagometer". *Autophagy* 2009; 5:585-9.
- Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36:2491-502.
- Tolle F, Risold PY, Mansuy-Schlick V, Rossi E, Boyer-Guittaut M, Fraichard A, Jouvenot M. Specific regional distribution of *gcl1* mRNAs in adult rat central nervous system. *Brain Res* 2008; 1210:103-15.
- Sou YS, Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP and GATE-16. *J Biol Chem* 2006; 281:3017-24.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008; 4:151-75.
- Katayama H, Yamamoto A, Mizushima N, Yoshimori T, Miyawaki A. GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell Struct Funct* 2008; 33:1-12.
- Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E. GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:637-44.
- Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3:542-5.
- Mansuy-Schlick V, Tolle F, Delage-Mourroux R, Fraichard A, Risold PY, Jouvenot M. Specific distribution of *gabarap*, *gcl1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR. *Brain Res* 2006; 1074:83-7.
- Sengupta A, Molkenin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 2009; 284:28319-31.
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 11:45-51.
- Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* 2004; 279:36268-76.
- Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* 2009; 122:2554-66.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8.
- Zheng YQ, Liu JX, Li XZ, Xu L, Xu YG. RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30:919-27.
- Lee JA. Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. *BMB Rep* 2009; 42:324-30.





**PUBLICATION V : Identification of HSP90 as a new  
GABARAPL1 (GEC 1)-interacting protein**

Stéphanie Seguin-Py, Géraldine Lucchi, Sophie Croizier, Fatima Zahra Chakrama, Gilles Despouy, **Jaclyn Nicole Le Grand**, Patrick Ducoroy, Wilfrid Boireau, Michaël Boyer-Guittaut, Michèle Jouvenot, Annick Fraichard and Régis Delage-Mourroux

*Biochimie* (2012) 94, 748-758.





## Research paper

## Identification of HSP90 as a new GABARAPL1 (GEC1)-interacting protein

Stéphanie Seguin-Py<sup>a</sup>, Géraldine Lucchi<sup>b</sup>, Sophie Croizier<sup>a</sup>, Fatima Z. Chakrama<sup>a</sup>, Gilles Despouy<sup>a</sup>, Jaclyn N. Le Grand<sup>a</sup>, Patrick Ducoroy<sup>b</sup>, Wilfrid Boireau<sup>c</sup>, Michaël Boyer-Guittaut<sup>a</sup>, Michèle Jouvenot<sup>a</sup>, Annick Fraichard<sup>a</sup>, Régis Delage-Mourroux<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université de Franche-Comté, EA3922 « Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central », IFR133, U.F.R. Sciences et Techniques, 16 route de Gray, 25030 Besançon Cedex, France

<sup>b</sup> CLIPP (Clinical Innovation Proteomic Platform), IFR100, Centre Hospitalier Universitaire de Dijon, Université de Bourgogne 1 rue du professeur Marion, 21000 Dijon, France

<sup>c</sup> Institut FEMTO-ST, UMR 6174 CNRS, Clinical & Innovation Proteomic Platform (CLIPP), Université de Franche-Comté, 32 avenue de l'Observatoire, 25044 Besançon Cedex, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 May 2011

Accepted 10 November 2011

Available online 20 November 2011

## Keywords:

17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG):GABA<sub>A</sub> receptor-protein-like 1 (GABARAPL1)  
Glandular epithelial cell 1 (GEC1)  
Heat shock protein 90 (HSP90)  
Michigan cancer foundation-7 (MCF-7)  
Proteasome inhibitors

## ABSTRACT

GABARAPL1 belongs to the small family of GABARAP proteins (including GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2/GATE-16), one of the two subfamilies of the yeast Atg8 orthologue. GABARAPL1 is involved in the intracellular transport of receptors, via an interaction with tubulin and GABA<sub>A</sub> or kappa opioid receptors, and also participates in autophagy and cell proliferation. In the present study, we identify the HSP90 protein as a novel interaction partner for GABARAPL1 using GST pull-down, mass spectrometry and coimmunoprecipitation experiments. GABARAPL1 and HSP90 partially colocalize in MCF-7 breast cancer cells overexpressed Dsred-GABARAPL1 and in rat brain. Moreover, treatment of MCF-7 cells overexpressed FLAG-GABARAPL1-6HIS with the HSP90 inhibitor 17-AAG promotes the GABARAPL1 degradation, a process that is blocked by proteasome inhibitors such as MG132, bortezomib and lactacystin. Accordingly, we demonstrate that HSP90 interacts and protects GABARAPL1 from its degradation by the proteasome.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

The *gabapril* (*gabapril like-1*) gene was originally discovered in our laboratory as an early estrogen-regulated gene in guinea pig endometrial glandular epithelial cells (GEC) and was therefore previously named *gec1* [1,2].

The GABARAPL1 protein is composed of 117 amino acids, which are highly conserved between species, and belongs to a small family of proteins, called the GABARAP family, based on sequence

**Abbreviations:** 17-AAG, 17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin; GABA<sub>A</sub>,  $\gamma$ -aminobutyric acid, type A; GABA<sub>A</sub>R,  $\gamma$ -aminobutyric acid, type A receptor; GABARAP, GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein; GABARAPL1, GABARAPL2, GABA<sub>A</sub> receptor-protein-like 1 and 2; GATE-16, golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa; GEC1, glandular epithelial cell protein 1; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione-S-transferase; HEK293, human embryonic kidney 293; HSP90, heat shock protein 90; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; KOR, kappa opioid receptor; MAP-LC3, microtubule-associated protein light chain 3; MCF-7, Michigan cancer foundation-7; NBR1, neighbour of BRCA1; Nix1/BNIP3L, BNIP3 like protein (BNIP3: Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein); NP-40, nonidet-P40; NSF, N-ethylmaleimide sensitive factor; RIP1, receptor interacting protein 1; UTR, untranslated region.

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 81 66 66 24; fax: +33 3 81 66 69 70.

E-mail address: [regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr](mailto:regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr) (R. Delage-Mourroux).

identity between the different members. In addition to GABARAPL1, this family also includes GABARAP (GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein), and GABARAPL2/GATE-16 (GABARAP like-2 protein/ Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa), which share 87% and 61% identity with GABARAPL1, respectively [3,4]. GABARAPL1 also presents a rather low homology with the MAP-LC3B (microtubule-associated protein light chain 3B) protein [5].

Very few studies regarding the expression of this protein have been conducted because of its strong identity with GABARAP. Indeed, the existence of an antibody that can discriminate between these two proteins has not yet been proven. The tissue specific expression of the *gabapril* mRNA, obtained with the use of a probe designed against a unique portion of the 3' UTR, however, reveals that *gabapril* is ubiquitously expressed with the highest expression levels observed in the brain. *Gabapril* mRNA is, in fact, the most strongly expressed amongst its closest counterparts in multiple rat brain areas ranging from the olfactory bulb to the brainstem and cerebellum, as well as in the spinal cord. In these structures, *gabapril* mRNA seems to be localized in neurons and particularly in motoneurons and neuroendocrine neurons [6,7].

The emergence of new GABARAPL1 protein partners has allowed us to hypothesize the role of this small protein in major cellular processes. GABARAPL1 has been shown to interact *in vitro*

with two essential membrane receptors in the brain: GABA<sub>A</sub>R (gamma-aminobutyric acid, type A receptor) and KOR (kappa opioid receptor) [8–10]. GABARAPL1 could thus participate in neuronal signal transmission by aiding in the transport of these membrane receptors to the cell surface. Tubulin and NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor), two other GABARAPL1 binding partners, may contribute to the intracellular trafficking of the two aforementioned receptors [8–11]. Tubulin is a major cell component of the cytoskeleton, known to aid in the guidance of intracellular trafficking, and NSF is already known to play a role in trafficking of neuronal receptors such as AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) type glutamate and  $\beta$ -adrenergic receptors. GABARAPL1, via its interaction with tubulin, is also able to promote tubulin assembly and microtubule bundling [8]. The contribution of GABARAPL1 to intracellular protein transport is not restricted to the brain as demonstrated by its interaction with PX-RICS [Phox-RhoGAP (GTPase-activating protein) involved in the  $\beta$ -catenin-N-cadherin and NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor signaling], a protein that mediates the transport of the N-cadherin/ $\beta$ -catenin complex from the ER to the Golgi apparatus in HeLa cells [12].

Due to the high homology between the different members of the GABARAP family, all GABARAPL1 partners outlined above also interact with one or several of the GABARAP family members. Two proteins, namely alpha-synuclein and ARH (Autosomal Recessive Hypercholesterolemia) have been described to interact only with the GABARAPL1 protein but their association with other GABARAP family members has not yet been addressed [13,14].

Some studies have reported a low expression of *gabarapl1* mRNA in different types of cancers and we recently demonstrated, from the study of a cohort of 265 breast adenocarcinoma biopsies, that patients with a high expression of *gabarapl1* mRNA present a lower risk of recurrence [15,16].

Recently, we also described GABARAPL1 as a new marker of autophagosomes. More precisely, we demonstrated that GABARAPL1 is cleaved in the cells to produce its mature form, is linked onto phospholipids and associates with autophagic vesicles [17,18]. Moreover, it has been suggested that GABARAPL1 plays a role in selective autophagy, a form of autophagy that targets specific proteins or organelles to be degraded in the lysosomes, due to its association with p62/SQSTM1 (Sequestosome 1), NBR1 (Neighbour of Brca1 gene) and Nix1/BNIP3L [BNIP3 like protein (BNIP3: Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein)], which have all been described as cargo adapters [19–22].

To search for new functions of the GABARAPL1 protein, we looked for new GABARAPL1 partners in rat brain, a tissue that highly expresses *gabarapl1*, by using a GST pull-down assay coupled to mass spectrometry. We report here an interaction between GABARAPL1 and the molecular chaperone HSP90 in rat brain and in MCF-7 cells. In cells, a specific inhibition of HSP90 ATPase activity by 17-AAG (17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin) disrupts this interaction whereas the use of the potent proteasome inhibitor MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) protects GABARAPL1 from degradation. GABARAPL1 can consequently now be defined as a new HSP90 client protein.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and tissue preparation

All animal use and care protocols were in accordance with institutional guidelines (all protocols were approved and investigators authorized). Sprague–Dawley rats were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France).

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of chloral hydrate 7% (1 ml/200 g), and then perfused as previously described [23] with 0.9% (w/v) NaCl followed by ice-cold 1% (w/v) paraformaldehyde fixative in 0.1 M phosphate buffer. The brains were removed, post-fixed in the same fixative overnight at 4 °C, immersed overnight in a 15% (w/v) sucrose solution at 4 °C, and then frozen over liquid nitrogen. Brains were serially cut into 10  $\mu$ m coronal sections on a cryostat-microtome, mounted on gelatinated slides and stored at –40 °C until further analysis.

### 2.2. Reagents and antibodies

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). The following antibodies were used: two different polyclonal anti-GABARAPL1 antibodies, one from Chemicon Millipore (AB15278) for Western blotting experiments and one from Protein Tech Group (11010-1-AP) for immunohistochemistry and immunoprecipitation experiments, polyclonal anti-GFP (Chemicon Millipore, AB3080), monoclonal anti-HSP90 (TebuBio, AC88), monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma–Aldrich, A2220), monoclonal anti-RIP1 (receptor interacting protein 1) (BD Pharmingen, 551041), monoclonal anti-tubulin (Abcam, ab56676) and polyclonal anti-actin (Sigma, A5060), MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al) (Sigma–Aldrich, C2211), bortezomib (Santa Cruz Biotechnology sc-217785), lactacystin (Santa Cruz Biotechnology, sc-3575) and 17-(Allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) (Sigma–Aldrich, A8476) were prepared in DMSO. The human recombinant HSP90 $\beta$  protein was purchased from Cayman Chemical (10342).

### 2.3. Plasmids

The pGEX-4T-2, pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1 and pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1 (22–117) vectors expressing the glutathione S-transferase (GST) enzyme, the GST-GABARAPL1 and the GST-GABARAPL1 (22–117) proteins were described previously [8]. The *gabarapl1* coding sequence flanked by two tag sequences, coding for a Flag peptide and a six-histidine tail, respectively, was cloned into the *Xba*I and *Bam*H1:*Bgl*II sites of the pSBet vector [24], allowing expression of the FLAG-GABARAPL1-6HIS protein in *Escherichia coli* bacteria. The pGST-HSP90 $\alpha$  and the pGFP-HSP90 $\beta$  vectors were kindly provided by Dr. Altieri (University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA) and Dr. J. Kim (Korea University, Seoul, South Korea), respectively.

### 2.4. Cell culture and transfection

The HEK293 (Human Embryonic Kidney 293) (ATCC, CRL-1573) and MCF-7 (Michigan Cancer Foundation) (ATCC, HTB-22) cells were cultured in DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium, Invitrogen, 11880) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Invitrogen, 25030-032), 100  $\mu$ g/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Invitrogen, 15140) and 10% (for the HEK293 cells) or 5% (for the MCF-7 cells) foetal bovine serum (FBS, Invitrogen, 10270-106) and kept in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. The MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS and MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cell lines were previously created [17]. These cell lines were maintained in complete medium supplemented with 100  $\mu$ g/ml Hygromycin B (PAA, P02-015) and 100  $\mu$ g/ml G418 (PAA, P02-012), respectively. TransFast reagent (Promega, E2431) was used to transiently transfect HEK293 cells plated in 10 cm-diameter culture dishes (5  $\times$  10<sup>6</sup> cells per Petri-dish) and Jet Prime reagent (Polyplus Transfection, 114-07) was used to transiently transfect MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells plated in 24-well plates (5  $\times$  10<sup>4</sup> cells per well), according to the manufacturer's recommendations. Ten  $\mu$ g or 500 ng of pGFP-HSP90 $\beta$

vector were used to transfect HEK293 and MCF-7 Dsred-GABARAPL1 cells, respectively.

MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells plated in 6-well plates ( $4 \times 10^5$  cells per well) or MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells plated in 24-well plates cultured on glass coverslips ( $5 \times 10^4$  cells per well) were treated overnight with  $1 \mu\text{M}$  of 17-AAG in complete medium for the inhibition of HSP90 activity in the presence or in the absence of  $2 \mu\text{M}$  MG132,  $5 \mu\text{M}$  lactacystin or  $25 \text{ nM}$  bortezomib for the inhibition of proteasome activity. Kinetics (17AAG, MG132) and dose effects (MG132, lactacystin, bortezomib) were conducted to test the efficiency of these different compounds. Total proteins extracts from 6-well plates were used for immunoblotting. Cells cultured in 24-well plates were analysed by confocal microscopy.

### 2.5. Expression, production and purification of fusion proteins

The pGST-HSP90 $\alpha$  vector, the pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1, the pGEX-4-T2 GST-GABARAPL1 (22–117), the pGEX-4-T2 GST-GABARAP and the pGEX-4-T2 GST-GATE-16 vectors were used to transform BL21-DE3 *E.coli*. The different fusion proteins expressed from these vectors were induced with  $0.5 \text{ mM}$  isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 2 h. The bacterial pellet, obtained by centrifugation (5000 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), was resuspended in 800  $\mu\text{l}$  of PBS (0.137 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) supplemented with 1% (v/v) Triton X-100, 1 mM protease inhibitors (Sigma–Aldrich P8340) and  $0.2 \text{ mM}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). After sonication (Sonic and Materials) (3 times for 15 s), a second centrifugation (10 000 g, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ ) was performed to clear the lysate. The GST-fusion proteins contained in the supernatant were bound to 100  $\mu\text{l}$  of glutathione-agarose beads (Sigma–Aldrich, G4510) for 2 h at  $4^\circ\text{C}$  under agitation. The beads were then washed 3 times in PBS supplemented with 500 mM NaCl.

The FLAG-GABARAPL1-6HIS protein was purified using a Ni-NTA Purification System (Qiagen 30210) according to the manufacturer's instructions. After induction of the pool of the proteins with IPTG, bacterial cells were incubated in lysis buffer (20 mM Tris–HCl, 20% (v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA, 500 mM KCl, 10 mM imidazole, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mg/ml lysozyme) for 30 min on ice. After sonication (3 times for 15 s) and centrifugation (16 000 g, 30 min,  $4^\circ\text{C}$ ), the cleared lysate was incubated with Ni-NTA resin for 2 h at  $4^\circ\text{C}$ . After centrifugation (5000 g, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ), the resin was washed 3 times in a wash buffer [20 mM Tris–HCl, 20% (v/v) glycerol, 0.2 mM EDTA, 100 mM KCl, 20 mM imidazole, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF]. The FLAG-GABARAPL1-6HIS protein was then eluted with increasing concentrations of imidazole (50–250 mM).

### 2.6. GST pull-down affinity

Total protein lysates from HEK293 cells transiently transfected by the pGFP-HSP90 $\beta$  vector or from rat brains (previously cut into small pieces and homogenized with a hand-driven Potter-Elvehjem apparatus) were obtained by incubation on ice for 30 min in GST pull-down lysis buffer [(10 mM Tris–HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5% (v/v) NP-40, 1% (v/v) Triton X100, 1 mM protease inhibitors (Sigma–Aldrich P8340)] followed by centrifugation (30 min, 16 000 g,  $4^\circ\text{C}$ ). Five mg of rat brain protein extract were incubated with GST or GST-GABARAPL1 (prepared as previously described) bound to 100  $\mu\text{l}$  of glutathione-agarose beads in GST pull-down lysis buffer overnight at  $4^\circ\text{C}$  under constant agitation. After three extensive washes in PBS supplemented with 200 mM NaCl, proteins were eluted in 40  $\mu\text{l}$  of SDS-PAGE loading buffer (78 mM Tris–HCl, pH 6.8, 2.5% (w/v) SDS, 12.5% (v/v) glycerol, 6.25% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.025% (w/v) bromophenol blue) and separated on a 10% or a 12.5% SDS-PAGE gel. After

Coomassie blue staining, seven protein bands of interest were excised from the gel and analysed by mass spectrometry. To test *in vitro* binding of GABARAPL1 with HSP90, GST pull-down experiments were performed using GST-HSP90 $\alpha$ , GST-GABARAPL1 or GST-GABARAPL1 (22–117) fusion proteins (prepared as previously described) immobilized on 100  $\mu\text{l}$  glutathione-agarose beads in combination with either a rat brain protein extract (5 mg) or a HEK293 expressing GFP-HSP90 $\beta$  cell lysate (1 mg) or a purified FLAG-GABARAPL1-6HIS protein (500 ng), or a human recombinant HSP90 $\beta$  protein (5  $\mu\text{g}$ ).

### 2.7. Mass spectrometry analysis

Bands of interest were excised manually from the SDS-PAGE gel and cut into 1 mm<sup>3</sup> pieces. The gel fragments were then washed in 0.1 M ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) for 10 min and dehydrated in acetonitrile for 10 min. Dried pieces of bands were incubated in the dark successively in 10 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP)/0.1 M ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) (30 min at  $37^\circ\text{C}$ ), acetonitrile (8 min), 55 mM iodoacetamide/0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (20 min), 0.1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (2 min) and acetonitrile (8 min). Each piece of band was then digested by 20  $\mu\text{l}$  of a digestion solution (10 ng/ $\mu\text{l}$  of trypsin in 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and 10% (v/v) acetonitrile (Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade, PROMEGA, V5280)) for 30 min at  $4^\circ\text{C}$ . Fifteen  $\mu\text{l}$  of this solution was subsequently removed and 10  $\mu\text{l}$  of 40 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /10% (v/v) acetonitrile was added, prior to incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h. Resulting peptides were concentrated on C18 (PerfectPure Eppendorf C18, 0030 008 405) according to the manufacturer's instructions. An aliquot (0.5  $\mu\text{l}$ ) of the concentrate solution was then deposited onto a Ground Steel MALDI target together with 1  $\mu\text{l}$  of matrix solution (3.5 mg/ml  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% (v/v) acetonitrile, 0.5% (w/v) trifluoroacetic acid). Peptides were analysed by MS and MS/MS with a MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) mass spectrometer. Proteins were identified by comparison to the rat MSDB (Mass Spectrometry protein sequence DataBase) databank.

### 2.8. Immunoprecipitation

Total protein lysates from MCF-7 cells or rat brains (previously cut into small pieces and homogenized with a hand-driven Potter-Elvehjem apparatus) were obtained by incubation on ice for 30 min in immunoprecipitation buffer [50 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% (v/v) NP-40, 1 mM protease inhibitors (Sigma–Aldrich P8340)] followed by a centrifugation (30 min, 16 000 g,  $4^\circ\text{C}$ ). The supernatants were then incubated with 30  $\mu\text{l}$  of magnetic beads (Dynabeads Protein G Invitrogen, 100-03D) together with 2  $\mu\text{g}$  of the indicated antibody [anti-FLAG M2 (Sigma–Aldrich) or anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group)] under constant agitation at room temperature for 10 min. MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cell lysate (100  $\mu\text{g}$ ) or rat brain extract (500  $\mu\text{g}$ ) were then added to the beads and incubated for 30 min at room temperature while agitating. After three washes in PBS, immunocomplexes were eluted in 2X SDS loading buffer and loaded on a 12.5% SDS-PAGE gel. The target proteins were then detected by immunoblotting as described below.

### 2.9. Western blot analysis

Whole cell lysates (40  $\mu\text{g}$ ) were separated by SDS-PAGE on a 10%, 12.5% or a 15% gel before transfer to an Immobilon-P PVDF membrane (Dutscher, 44088). The membranes were blocked with 5% (w/v) skim milk in 0.1% Tween 20/TBS (10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20) and incubated at  $4^\circ\text{C}$  overnight

with primary antibodies in antibody block buffer (0.5% (w/v) skim milk in 0.1% (v/v) Tween 20/TBS). The following antibodies were used at the indicated dilution: polyclonal anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore) (1:2000), polyclonal anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group) (1:1000), polyclonal anti-HSP90 $\beta$  (1:3000), monoclonal anti-HSP90 (1:2000), polyclonal anti-GFP (1:5000), monoclonal anti-RIP1 (1:2500), monoclonal anti-tubulin (1:10 000) and polyclonal anti-actin (1:10 000). Immunoreactive bands were detected using goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-mouse (P.A.R.I.S, BI 2413C) or anti-rabbit (P.A.R.I.S, BI 2407C) antibodies (1:20 000 in antibody block buffer) and ECL Plus reagent (GE Healthcare Life Sciences, RPN2132), according to the manufacturer's protocol.

### 2.10. Immunohistochemistry

Rat brain sections were rinsed in PBS supplemented with 0.3% (v/v) Triton X100 and incubated overnight with the primary anti-GABARAPL1 antibody (1:200) diluted in PBS containing 0.3% (v/v) Triton X100, 1% (w/v) bovine serum albumine, 10% (w/v) skim milk and 0.01% (w/v) sodium azide at room temperature. The labeling was then revealed with a secondary goat anti-rabbit IgG conjugated Alexa Fluor-488 (1:800, Invitrogen) for 1 h at room temperature. Then, sections were incubated, under the same conditions, with the monoclonal anti-HSP90 (1:400) antibody diluted in PBS containing 0.3% (v/v) Triton X100 and revealed with a donkey anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor-555 (1:800, Invitrogen). Fluorescent sections were then observed using a confocal microscope described below.

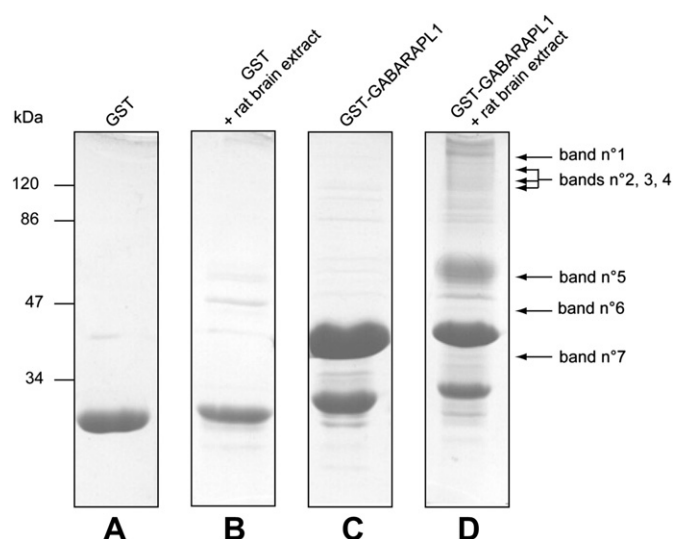
### 2.11. Confocal microscopy analysis

Cells grown on coverslips were fixed in PBS-paraformaldehyde 4% (w/v) (PFA, Sigma–Aldrich, P6148) for 15 min and washed once with PBS. Cells and labeled brain sections were then analysed using a fluorescence laser scanning confocal microscope Fluoview FV1000 BX (Olympus, France). Images were obtained through a DP 75 numeric camera using the Fluoview FV1000 software (Olympus, France).

## 3. Results

### 3.1. Identification of new GABARAPL1-interacting partners

In order to further understand the biological functions of GABARAPL1, we searched for new interacting partners of this protein using rat brain protein extracts in a GST pull-down experiment coupled to mass spectrometry. Proteins eluted from the GST pull-down experiments were separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining. Many proteins displayed a specific interaction with GST-GABARAPL1 (Fig. 1D). Seven intensive bands not present or of lower intensity in the control tracks [corresponding to GST alone (Fig. 1A), GST incubated with rat brain extract (Fig. 1B) and GST-GABARAPL1 alone (Fig. 1C)] were excised from the gel and analysed by mass spectrometry. Of the various potential GABARAPL1 protein partners identified, eleven were confirmed by both MS and MS/MS analysis (Table 1). Among all identified proteins, we recovered tubulin, a protein already known to interact *in vitro* with GABARAPL1 [8] and clathrin heavy chain, a protein described to associate with GABARAP [25]. The HSP90 $\beta$  protein corresponding to the 84 kDa heat shock protein (Q1PSW2) identified in band n°4 (Fig. 1D) by both MS (Mascot score: 63) and MS/MS (two peptides with respectively a Mascot score of 63 and 61) was particularly interesting due to its implication in numerous cellular processes such as protein folding, stress response, signal



**Fig. 1.** Identification of new GABARAPL1-interacting proteins by GST pull-down assay coupled to mass spectrometry. GST (A, B) and GST-GABARAPL1 (C, D) were expressed in *E. coli* and purified by glutathione-agarose affinity chromatography prior to incubation with rat brain protein extracts (B, D). After extensive washing, bound material was resolved by SDS-PAGE (10%) and analyzed by Coomassie staining. Several proteins specifically bound GABARAPL1 and seven bands were excised from the gel to undergo tryptic digestion and mass spectrometry analysis (Table 1).

transduction and tumor progression [26–28]. In the rat central nervous system (CNS), HSP90 is markedly expressed throughout all neuronal subpopulations suggesting its functional role in the CNS [29]. Moreover, a recent global analysis of the human autophagic gene network has identified new GABARAPL1 protein partners including the HSP90 protein in HEK293 cells using immunoprecipitation coupled to mass spectrometry [30].

### 3.2. GABARAPL1 interacts with HSP90

#### 3.2.1. GST pull-down experiments

A variety of GST pull-down experiments using GST and different GST-fusion proteins [GST-HSP90 $\alpha$ , GST-GABARAPL1, GST-GABARAPL1 (22–117)] were used to confirm the interaction between GABARAPL1 and both HSP90 $\alpha$  and  $\beta$  isoforms. A GST pull-down assay using recombinant bacterial GST-GABARAPL1 and rat brain protein extracts coupled to Western blot analysis confirmed the *in vitro* interaction of this protein with HSP90 (Fig. 2A). A GST pull-down assay followed by Western blot analysis using an anti-GFP antibody also demonstrated an interaction between these two proteins in HEK293 cells transiently expressing GFP-HSP90 $\beta$  (Fig. 2B).

Two different GST pull-down experiments utilizing either GST-GABARAPL1 and the human recombinant HSP90 $\beta$  protein or GST-HSP90 $\alpha$  and the purified FLAG-GABARAPL1-6HIS protein demonstrated the direct interaction between GABARAPL1 and HSP90 $\alpha$  or HSP90 $\beta$  (Fig. 2C, D).

Mansuy and colleagues have demonstrated, using a deletion mutant of GABARAPL1 in a GST pull-down experiment, that the 22 amino-terminal residues of GABARAPL1 are necessary for tubulin binding [8]. In order to determine if this region of GABARAPL1 is also responsible for its interaction with HSP90 $\beta$ , we subsequently tested the ability of this deletion mutant to interact with HSP90 $\beta$  in a pull-down assay performed with HEK293 GFP-HSP90 $\beta$  cell lysates and with the human recombinant HSP90 $\beta$  protein. The intensity of the signals corresponding to GFP-HSP90 $\beta$  and HSP90 $\beta$  was strongly reduced when using the deletion mutant compared to the wild-



**Table 1**  
Mass spectrometry results for the seven bands identified by MALDI-TOF MS and/or MS/MS following GST pull-down experiments performed from total rat brain extract.

Bands	Protein (accession number)	Theoretical vs apparent MW (kDa) <sup>a</sup>	Matched peptides (MS mode)	Percentage of coverage	Mascot score <sup>b</sup>	<i>m/z</i> of the precursor ion (MS/MS mode) <sup>c</sup>	Mascot score <sup>d</sup>
1	Clathrin heavy chain (P11442)	193.2/180	63	37.7	447	1296 1942	44 96
2	RIM2-5B (Q9JIS1)	173.2/140	35	26.5	61		
3	D100 protein (dynamin) (P21575)	96.2/120	25	24.5	96	2093	32
	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> exchanging ATPase alpha-3 chain (P06687)	113/120	14	17.6	61		
	AP-2 complex subunit alpha-2 (P18484)	104.8/120	11	14.3	63	1586	31
4	84 kDa heat shock protein (HSP90β) (Q1PSW2)	83.6/110	19	30	63	2255 1348	63 61
	Proteasome 26-S subunit non-ATPase 2 (Q4FZT9)	100.9/110	19	30.2	63		
5	Tubulin beta-2 (Q6P9T8)	50.2/55	37	68.8	228	1229 1620 2014	70 48 69
	Tubulin alpha chain (P68370)	50.8/55	25	59.6	133	1756 2415	81 94
6	LanC lantibiotic synthetase component C-like 1 (Q9QX69)	46/45	10	21.6	66	1359	43
7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Q9QWU4)	36.1/40	18	42.6	113	1779	73
	Guanidine nucleotide binding protein beta 2 (P54313)	37.3/40				1336	57
	Microtubule-associated protein 1B (P15205)	269.5/40	–	–	–	1927	52

<sup>a</sup> The reported theoretical MW is that of the protein in the database MSDB.

<sup>b</sup> In MS mode, a Mascot score above 56 is significant ( $p < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Precursor ions are single-charged unless stated.

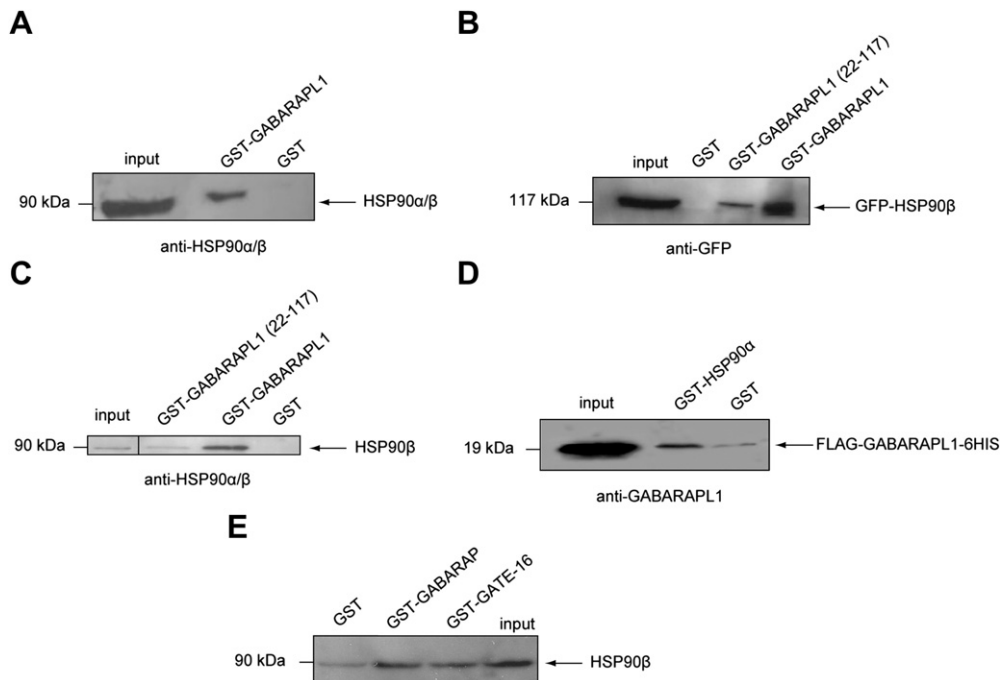
<sup>d</sup> In MS/MS mode, a Mascot score above 30 is significant ( $p < 0.05$ ).

type protein, showing that the amino-terminus of GABARAPL1 largely contributes to the interaction with HSP90β (Fig. 2B, C).

Moreover, a direct interaction between GST-GABARAP or GST-GATE-16 and human recombinant HSP90β protein was also established (Fig. 2E) demonstrating that HSP90β could also have a chaperone effect on other members of the GABARAP family.

### 3.2.2. Coimmunoprecipitation experiments

To confirm this interaction *in vivo*, we performed an immunoprecipitation experiment using rat brain extracts and an anti-GABARAPL1 antibody (Protein Tech Group) or an anti-FLAG M2 antibody (Sigma–Aldrich) followed by Western blotting using anti-GABARAPL1 (Chemicon, Millipore) and anti-HSP90 antibodies



**Fig. 2.** GABARAPL1 interacts with HSP90 *in vitro*. (A) Total proteins from rat brain were incubated with either GST-GABARAPL1 or GST. Input represents 0.8% of the amount of rat brain extract used in pull-down. (B) HEK293 GFP-HSP90β cell lysate was incubated with either GST, GST-GABARAPL1 or GST-GABARAPL1 (22–117). Input represents 20% of the amount of cell lysate used in pull-down. (C) Human recombinant HSP90β protein was incubated with either GST, GST-GABARAPL1 or GST-GABARAPL1 (22–117). Input represents 10% of the amount of the recombinant protein used in pull-down. (D) Recombinant FLAG-GABARAPL1-6HIS protein was incubated with either GST or GST-HSP90α. Input represents 10% of the recombinant protein used in pull-down. (E) Human recombinant HSP90β protein was incubated with either GST, GST-GABARAP or GST-GATE-16. Input represents 10% of the amount of the recombinant protein used in pull-down. For each GST pull-down experiment the bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE and analysed by Western blotting using either anti-HSP90 (A, C, E) or anti-GFP (B) or anti-GABARAPL1 (Chemicon Millipore) antibodies (D). Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

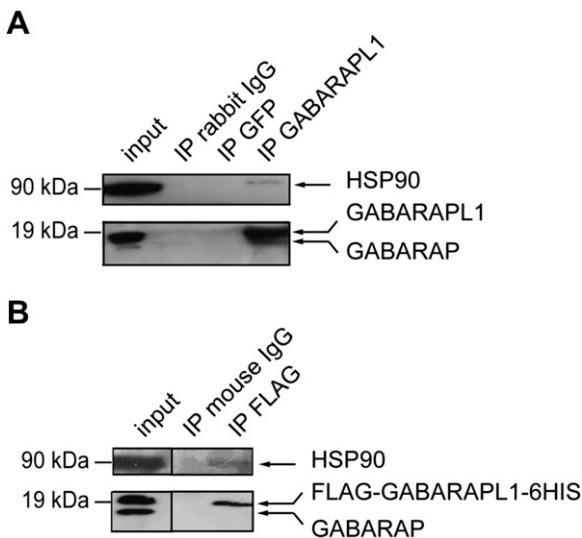


(Fig. 3). The anti-GABARAPL1 antibody from Chemicon cross-reacts with GABARAP and GABARAPL1 while the antibody from Protein Tech Group shows little to no cross-reaction with the GABARAP protein under the conditions used (data not shown). In Fig. 3, we note that the HSP90 protein was coimmunoprecipitated with GABARAPL1, confirming an interaction between HSP90 and GABARAPL1 in rat brain (Fig. 3A) and in MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells (Fig. 3B). Three different irrelevant antibodies (anti-rabbit GFP, anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG) were used as immunoprecipitation negative controls. The use of an anti-GABARAPL1 antibody (Chemicon, Millipore) that detects both GABARAPL1 and GABARAP for Western blot analysis showed two bands of different intensity in the brain, a higher and more intense band corresponding to GABARAPL1 and the other one corresponding to GABARAP (Fig. 3A). This observation also suggests that GABARAP could interact with HSP90 or that GABARAP was coimmunoprecipitated with GABARAPL1. In MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells, however, the GABARAPL1/HSP90 interaction is indubitable given that GABARAP could not be immunoprecipitated by the anti-FLAG antibody (Fig. 3B).

### 3.3. GABARAPL1 colocalizes with HSP90

#### 3.3.1. Colocalization in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells

Following demonstration of an *in vitro* and an *in vivo* interaction between GABARAPL1 and HSP90, we investigated the possibility of a colocalization of these two proteins in the MCF-7-Dsred-GABARAPL1 stable cell line transiently transfected with a plasmid encoding the GFP-HSP90 $\beta$  protein. This stable cell line over-expresses the red fluorescent Dsred-GABARAPL1 fusion protein, which localizes to perinuclear intracytoplasmic vesicles described to be autophagosomes and lysosomes [17]. Following transfection, the GFP-HSP90 $\beta$  protein was widely expressed throughout the cell, mainly in the cytoplasm, but also displayed punctate staining. Amongst these dots, a partial colocalization of GABARAPL1 with GFP-HSP90 $\beta$  was clearly observed (Fig. 4A).



**Fig. 3.** GABARAPL1 interacts with HSP90 *in vivo*. Immunodetection of HSP90 and GABARAPL1 (Chemicon antibody) from 500  $\mu$ g of rat brain extract (A) and 100  $\mu$ g of MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cell lysate (B) after GABARAPL1 immunoprecipitation [anti-GABARAPL1 antibody (Protein Tech Group) (A) or anti-FLAG antibody (B)]. Three irrelevant antibodies (IP GFP, IP rabbit IgG or IP mouse IgG) were used. Inputs represent 8% (A) and 40% (B) of the amount of cell lysate used in immunoprecipitation. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

#### 3.3.2. Colocalization in rat brain

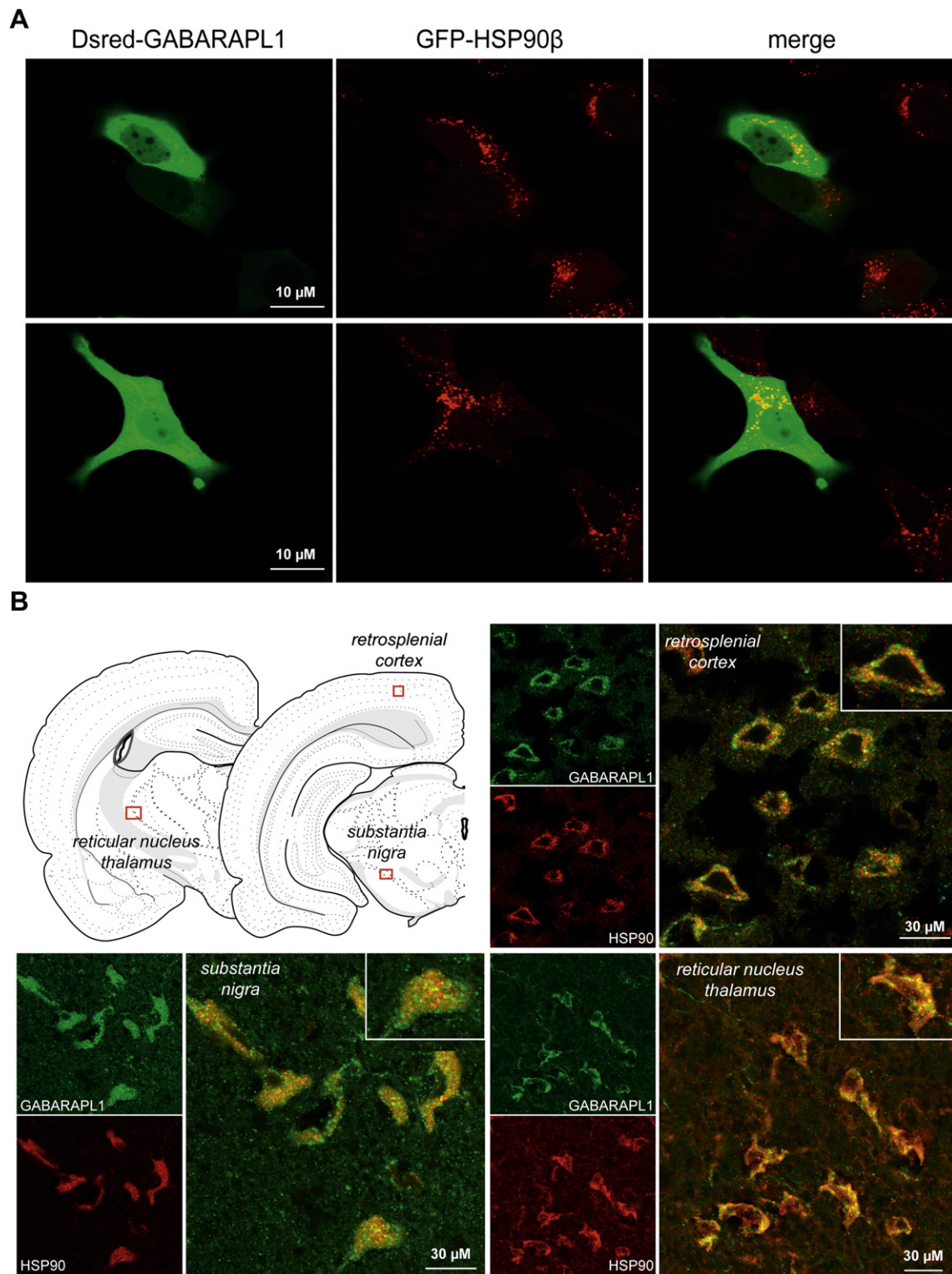
To study if this colocalization also occurs *in vivo*, we performed immunohistochemistry on rat brain sections within the dorsal retrosplenial cortex, *substantia nigra* and *reticular nucleus thalamus* using anti-GABARAPL1 (Protein Tech Group) and anti-HSP90 antibodies. The anti-GABARAPL1 antibody has been previously used in immunofluorescence staining to detect GABARAPL1 in HT29 cells [31]. These brain areas were previously described to display a strong expression of *gabarapl1* mRNA [6,7]. GABARAPL1 and HSP90 were highly expressed as intracytoplasmic dots and, in agreement with the results obtained in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells, a partial colocalization was observed. Furthermore, both these proteins also presented a diffuse expression throughout the cytoplasm, where they partially colocalized (Fig. 4B).

#### 3.4. 17-AAG promotes proteasome-dependent degradation of GABARAPL1

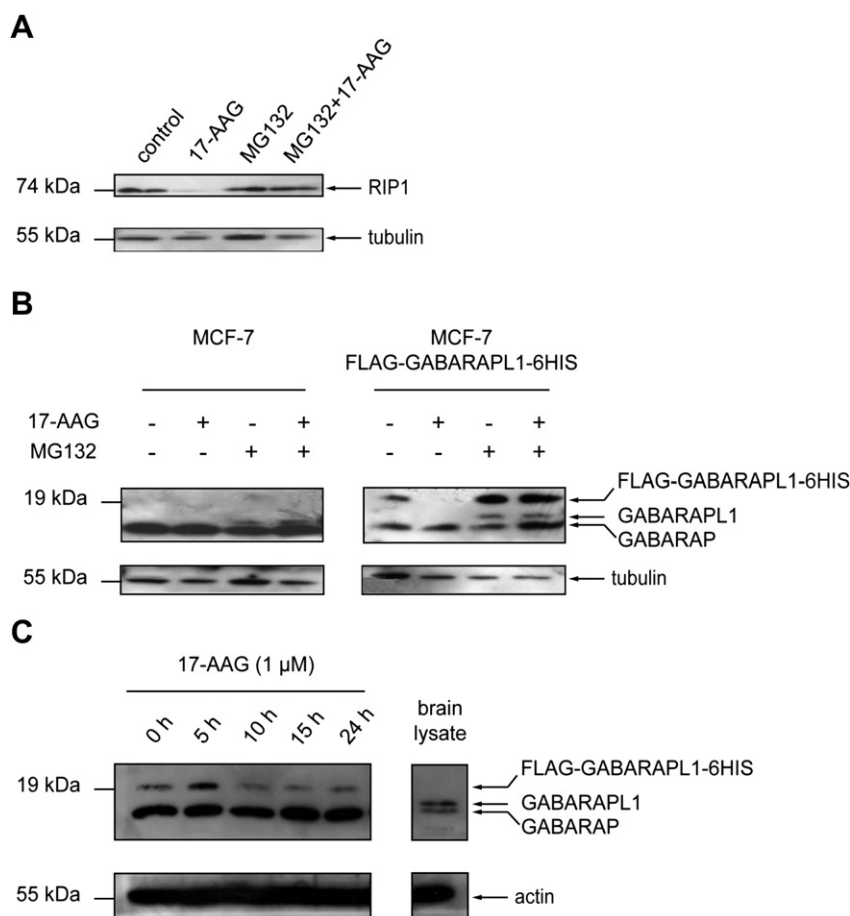
HSP90 is a chaperone for several client proteins involved in transcriptional regulation, signal transduction and cell cycle control [26,27]. The HSP90 activity inhibitor 17-AAG, an analogue of geldanamycin, blocks the association of HSP90 with its substrates by disrupting its ATPase function leading to the degradation of these client proteins. The majority of proteins whose stability is regulated by HSP90 are degraded by the proteasome [32,33].

Wild-type MCF-7 cells and MCF-7 cells stably expressing the FLAG-GABARAPL1-6HIS fusion protein were treated with 1  $\mu$ M of 17-AAG with or without the specific proteasome inhibitor MG132 for 15 h. The efficacy of treatment was first verified by immunodetection of the protein RIP1 in MCF-7 cells (Fig. 5A). The protein RIP1 is a well known HSP90 client protein as proved by disruption of the interaction between these two proteins following geldanamycin treatment. Moreover, geldanamycin-induced degradation of RIP1 was abrogated by MG132 treatment [34].

Similar results were obtained with the GABARAPL1 protein (Fig. 5B). Two signals were apparent in MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells in immunoblotting experiments using the anti-GABARAPL1 antibody from Chemicon. The higher molecular weight band corresponded to FLAG-GABARAPL1-6HIS and the lowest one corresponded to GABARAP. Only one signal corresponding to FLAG-GABARAPL1-6HIS was detectable with the anti-FLAG M2 antibody (Sigma–Aldrich) (data not shown). The endogenous GABARAPL1 protein is not usually apparent in immunoblot experiments performed on untreated MCF-7 and MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells. 17-AAG treatment caused a marked decrease in the level of FLAG-GABARAPL1-6HIS protein compared with non-treated cells. The maximal effect of this compound in MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells is observed after 15 h of treatment (Fig. 5C). This result indicates that GABARAPL1 may be a client protein for active HSP90 since the molecular chaperoning activity of HSP90 appears to play an important role in the stability of GABARAPL1 in cells. We therefore hypothesized, that following treatment with 17-AAG, the interaction between the two proteins is abolished leading to FLAG-GABARAPL1-6HIS degradation by the proteasome. To confirm our hypothesis, we treated MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells with the MG132 proteasome inhibitor. This treatment considerably enhanced the level of FLAG-GABARAPL1-6HIS in the cells. Interestingly, double treatment with 17-AAG and MG132 led to the same result, implying that proteasomal inhibition prevents the degradation of GABARAPL1 induced by 17-AAG. As an aside, an additional signal, located between the bands corresponding to FLAG-GABARAPL1-6HIS and endogenous GABARAP, was observed in this experiment. We propose that this signal corresponds to the endogenous GABARAPL1 protein. The treatment of non-transfected MCF-7 cells with MG132 revealed this



**Fig. 4.** GABARAPL1 partially colocalizes with HSP90 in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells and in rat brain. (A) MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells were transfected by GFP-HSP90 $\beta$ -expressing vector. 36 h after transfection, cells were fixed and analysed by confocal microscopy. (B) GABARAPL1 (detected with the Protein Tech Group antibody) and HSP90 proteins from dorsal retrosplenial cortex, *substantia nigra* or reticular nucleus thalamus (schematically represented in two rat brain frontal sections) were analysed by confocal microscopy following immunohistochemistry experiments. Top right images correspond to a 1.5-fold to a 2-fold magnification of the selected cells. Images were acquired at a 120 $\times$  magnification for dorsal retrosplenial cortex and *substantia nigra* and at a 90 $\times$  magnification for *reticular nucleus thalamus*. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.



**Fig. 5.** GABARAPL1 is a client protein of HSP90. (A) MCF-7 cells were treated with MG132 (2 μM) or/and 17-AAG (1 μM) for 15 h. Western blotting experiments were performed for RIP1 and tubulin. (B) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells or MCF-7 cells were treated with MG132 (2 μM) or/and 17-AAG (1 μM) for 15 h. Western blotting experiments were performed for GABARAPL1 (with the Chemicon antibody) and tubulin. (C) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with 1 μM of 17-AAG for 1–15 h. Rat brain protein lysate (40 μg) was used as positive control. Western blotting experiments were performed for GABARAPL1 (with the Chemicon antibody) and actin. A representative experiment of three performed is shown.

same new signal, strongly suggesting the enhancement of endogenous GABARAPL1 protein levels, as well.

As shown in Fig. 6A and B, the MG132 effect is maximal at a concentration of 2 μM and after 15 h of treatment. We then used two different proteasome inhibitors (lactacystin and bortezomib) to confirm that this effect is not due to side effects of MG132. As already observed in the MG132 experiments, treatment with either of these two chemicals resulted in an increased expression of FLAG-GABARAPL1-6HIS and the apparition of a signal corresponding to endogenous GABARAPL1 (from 2.5 μM of lactacystin and from 10 nM of bortezomib) (Fig. 6C, D). We can thus confirm the expression of endogenous GABARAPL1 following proteasomal degradation blockade.

Interestingly, unlike GABARAPL1, no variation of GABARAP expression was observed with any of the proteasomal inhibitors tested, suggesting that these two highly related proteins are subjected to different post-translational regulation in cells under the conditions tested (Figs. 5 and 6).

Consequently, we can conclude that disruption of the chaperoning activity of HSP90 by 17-AAG causes the degradation of exogenous FLAG-GABARAPL1-6HIS and endogenous GABARAPL1 through the proteasome since the use of proteasome specific inhibitors leads to an accumulation of both the FLAG-GABARAPL1-6HIS and GABARAPL1 proteins in the cells.

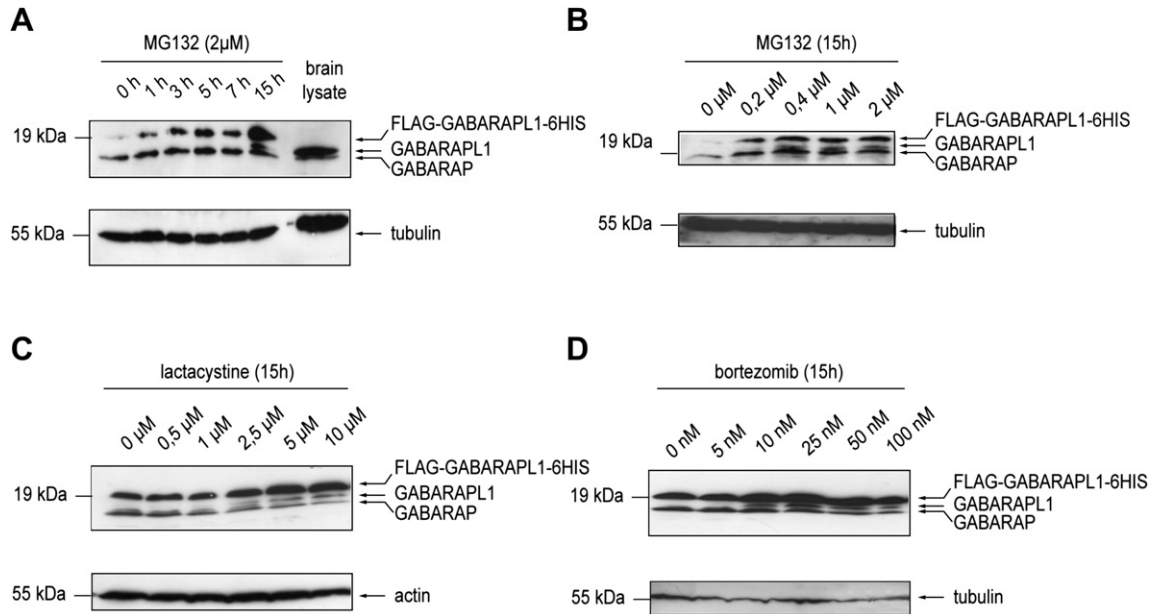
Finally, we assessed effects of this disruption on the cellular localization and/or expression of Dsred-GABARAPL1 in MCF-7 cells

by confocal microscopy (Fig. 7). Similar to the results obtained by Western blot, 17-AAG treatment led to the reduction of Dsred-GABARAPL1 staining, whereas an opposite effect was observed when cells were stimulated with MG132 and 17-AAG combined with MG132.

#### 4. Discussion

In this study, a GST pull-down assay followed by mass spectrometry analysis led to the discovery of various new GABARAPL1 partners, opening the door to new functional investigations for this protein. Among these partners, we identified HSP90β as a new GABARAPL1-interacting protein. We also confirmed previously published GABARAPL1 and/or GABARAP protein-interactions. For example, we found the clathrin heavy chain protein, a GABARAP cellular partner that is essential in the formation of coated vesicles [25]. In the brain, neurons regulate the number of postsynaptic receptors, such as GABA<sub>A</sub> receptors, by internalization in clathrin-coated vesicles. Amongst identified proteins in mass spectrometry analysis, we also found the AP-2 (adaptor protein-2) and dynamin (D100) proteins which are known to take part in GABA<sub>A</sub> receptors endocytosis [35,36]. Consequently, GABARAPL1 may associate with these three proteins to aid in the turnover of GABA<sub>A</sub> receptors. Subunits of tubulin were also identified, reinforcing the hypothesis that GABARAPL1 mediates intracellular trafficking of proteins, such as GABA<sub>A</sub> or k-opioid receptors, in the brain [8,9,11].



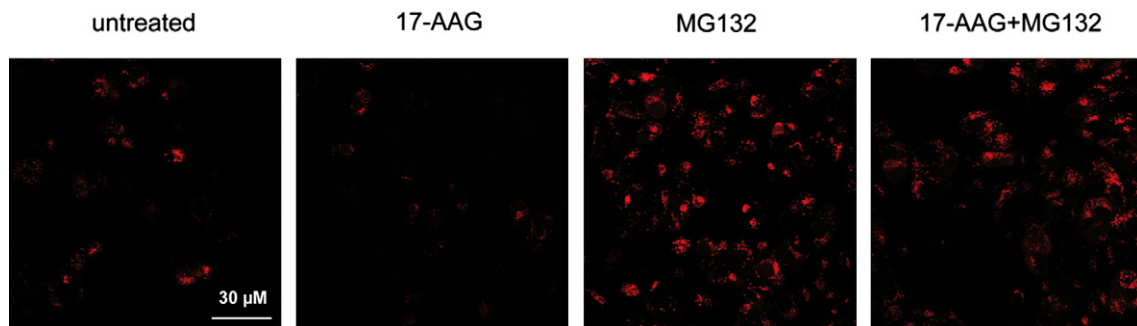


**Fig. 6.** GABARAPL1 degradation is inhibited by proteasome inhibitors. (A) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with 2  $\mu\text{M}$  of MG132 for 1–15 h. Rat brain protein lysate (40  $\mu\text{g}$ ) was used as positive control. Western blotting was performed for GABARAPL1 (Chemicon antibody) and tubulin. (B) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with different concentrations of MG132 (0.2  $\mu\text{M}$ –2  $\mu\text{M}$ ) for 15 h. Western blotting was performed to detect GABARAPL1 (Chemicon antibody) and tubulin. (C) (D) MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cells were treated with different concentrations of lactacystin (0.5  $\mu\text{M}$ –10  $\mu\text{M}$ ) (C) or bortezomib (5 nM–100 nM) (D) for 15 h. Western blottings were performed for GABARAPL1 (Chemicon antibody), tubulin and actin. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

We then focused our attention on the potential new GABARAPL1-interacting partner HSP90 $\beta$  because of its involvement in various cellular processes including cell proliferation, differentiation and apoptosis [37]. HSP90 is a highly conserved and abundant protein in eukaryotic cells, corresponding to 1–2% of total cellular proteins under non-stress conditions [26]. There are two major cytoplasmic isoforms of HSP90, HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ , which share approximately 86% identity in vertebrate species [38]. HSP90 is a molecular chaperone that interacts with multiple co-chaperones to assure the maintenance of protein quality in the cell by regulating the balance between folding and degradation of proteins. A growing list of HSP90 client proteins, which now includes several hundreds of proteins, is currently maintained by the laboratory of Didier Picard [39]. HSP90 client proteins include a variety of transcription factors such as mutated p53, protein kinases (Akt, ErbB2, Raf, RIP1), cell surface receptors and cellular enzymes. The NH<sub>2</sub>-terminal ATP/ADP binding pocket of HSP90 is important for its folding function as a chaperone. Moreover, this domain is the binding site of specific drugs including ansamycin antibiotics such

as geldanamycin and its modified derivative 17-AAG [40]. These drugs competitively inhibit ATP binding and induce a conformational change in the HSP90 molecule that results in a destabilization of its interaction with its chaperoned proteins and their subsequent degradation through the proteasome pathway [41]. These drugs also display antitumor activity in numerous animal tumor models and their effects are currently being evaluated in several clinical trials [33,42–44].

In this work, we demonstrate that GABARAPL1 interacts directly with both HSP90 $\alpha$  and  $\beta$  isoforms as demonstrated by use of either purified GST-HSP90 $\alpha$  or HSP90 $\beta$  proteins in GST pull-down assays and by use of an antibody directed against the two isoforms in coimmunoprecipitation experiments. In the immunoprecipitation experiment performed using rat brain extracts, an antibody directed against GABARAPL1 *versus* GABARAP was used to immunoprecipitate GABARAPL1 and an antibody recognizing the two proteins was used in immunoblot. In the brain, the GABARAP protein, although to a lesser extent than GABARAPL1, was immunoprecipitated disallowing us to exclude the possibility of an



**Fig. 7.** Dsred-GABARAPL1 expression in MCF-7 cells is modified following 17-AAG and MG132 treatments. Cells ( $5 \times 10^4$ ), plated on coverslips, were treated with 17-AAG (1  $\mu\text{M}$ ), MG132 (2  $\mu\text{M}$ ) or both agents for 15 h. Cells were then fixed and analysed by confocal microscopy. Images were acquired at a 40 $\times$  magnification. Each figure represents one of three independent experiments performed with similar results.

interaction between GABARAP and HSP90 or between GABARAPL1 and GABARAP. However, in the MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS cellular model, the specific interaction between GABARAPL1 and HSP90 is confirmed with the use of an anti-FLAG antibody, which specifically immunoprecipitates GABARAPL1. Moreover, the interaction between GABARAP or GATE-16 and HSP90 $\beta$  was confirmed by *in vitro* pull-down experiments and was also observed by Behrends et al. in HEK293 cells [30]. This same study revealed, on one hand, a potential interaction between HSP90 $\alpha$  and/or  $\beta$  isoforms and all other Atg8 family members, GATE-16, LC3A, LC3B and LC3C and on the other hand, the interaction between GABARAPL1 and other HSP proteins such as HSP70, HSP60 and HSP105.

Mansuy et al. previously demonstrated that the first 22 amino-terminal residues of GABARAPL1 are implicated in tubulin binding [8]. Here, we show that the presence of this basic N-terminal region (pHi 9.6) allows for a stronger interaction between GABARAPL1 and the acidic HSP90 protein (pHi 5). Distribution of both GABARAPL1 and HSP90 proteins was analysed in MCF-7 stably expressing Dsred-GABARAPL1 and in three rat brain regions known to express high levels of *gabapap1* mRNA (retrosplenial cortex, *substantia nigra* and *reticular nucleus thalamus*). Experiments performed in MCF-7-Dsred-GABARAPL1 cells revealed a partial colocalization of Dsred-GABARAPL1 and GFP-HSP90 $\beta$  in intracytoplasmic perinuclear dots. A similar partial colocalization was found in the two rat brain regions studied by immunohistochemistry.

The role of the association between GABARAPL1 and HSP90 was established by the use of the HSP90 activity specific inhibitor 17-AAG. Following disruption of the interaction between the two proteins, the degradation of GABARAPL1 was demonstrated to be mediated by the proteasome as established by the use of various potent proteasome inhibitors. Interestingly, unlike GABARAPL1, GABARAP protein levels were not affected by the different treatments despite the fact that GABARAP might interact with HSP90, highlighting a major difference in the regulation of these two closely related homologues. We have demonstrated, using quantitative RT-PCR experiments an increase of the endogenous *gabapap1* mRNA level in MCF-7 cells treated by MG132 (data not shown). Moreover, gene profiling studies of prostate cancer cells treated with MG132 and pancreatic cancer cells treated with bortezomib revealed an up-regulation of *gabapap1* and *lc3* mRNA [45,46]. However, in our MCF-7-FLAG-GABARAPL1-6HIS model, the rate of synthesis of the fusion protein increases independently of the transcriptional activation. On the other hand, the increase of the endogenous GABARAPL1 protein level is due to a regulation of its stability associated with a transcriptional regulation of the *gabapap1* gene. Recent studies have demonstrated that inhibition of proteasomal degradation by specific inhibitors induces autophagy, identified by accumulation of LC3B-II, the lipidated form of LC3B that localizes to autophagosomes [47–49]. It is now obvious that these two major routes of degradation are intimately linked. In particular, impairment of degradation by the proteasome pathway causes induction of autophagy [50]. Surprisingly, no presence of the GABARAPL1-II form, already observed in cells by Chakrama et al. in autophagic conditions [17], is detectable in our experiments, suggesting that GABARAPL1 is not associated to autophagic vesicles following the inhibition of proteasomal activity. These observations therefore describe a differential regulation of GABARAPL1 and LC3B in presence of proteasome inhibitors.

Generally, prior ubiquitinylation of the majority of HSP90 client proteins is required for them to be recognized and subsequently delivered to the proteasome. Some oncosuppressive client proteins, however, such as p53, display a ubiquitin-independent degradation by the proteasome [51]. Preliminary results show that GABARAPL1 is not ubiquitinylated as shown for LC3B (data not shown). Indeed, LC3B can be processed by the 20S core proteasome in a ubiquitin-

independent manner *in vitro* and this degradation is inhibited by its interaction with p62, a mediator of autophagic proteolysis [52]. Concerning GABARAP, Chen et al. suggest that GABARAP does not undergo the ubiquitinylation process and is not degraded through the proteasome after lactacystin treatment in rat cultured hippocampal neurons [53].

In this report, we successfully screened for novel GABARAPL1 binding partners by performing a simple pull-down assay coupled to mass spectrometry, demonstrating that GABARAPL1 associates with the HSP90 protein and providing evidence for a direct interaction between these two proteins. This study shows, for the first time, that HSP90 protects GABARAPL1 from its proteasomal degradation and therefore increases its stability in MCF-7 cells. These findings provide new and interesting information about the GABARAPL1 turnover within the cell.

## Acknowledgements

We are grateful to Dr. Altieri, Dr. J. Kim and Dr. Elazar for kindly providing the pGST-HSP90 $\alpha$ , the pGFP-HSP90 $\beta$  and the pGEX-4-T2 GST-GATE-16 vectors respectively. We would like to thank Fabrice Poncet, Sophie Launay (Plateformes microscopie et séquençage, IFR133, Besançon), Valérie Perez and Elodie Bôle-Richard for their technical help.

This work was supported by a grant from Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination InterRégionale-Grand Est), Comité du Doubs. Stéphanie Seguin-Py is supported by a fellowship from Région de Franche-Comté/Cancéropôle Grand-Est. Sophie Croizier, Fatima Zahra Chakrama and Jaclyn Nicole Le Grand are supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR).

## References

- [1] I. Pellerin, C. Vuillemoz, M. Jouvenot, C. Ordener, M. Royez, G.L. Adessi, Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 90 (1993) R17–R21.
- [2] N. Le Grand, F.Z. Chakrama, S. Seguin-Py, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot, M. Boyer-Guittaut, GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy* 7 (2011) 1302–1307.
- [3] Y. Paz, Z. Elazar, D. Fass, Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 25445–25450.
- [4] Y. Sagiv, A. Legesse-Miller, A. Porat, Z. Elazar, GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28, *Embo J.* 19 (2000) 1494–1504.
- [5] Y. Xin, L. Yu, Z. Chen, L. Zheng, Q. Fu, J. Jiang, P. Zhang, R. Gong, S. Zhao, Cloning, expression patterns, and chromosome localization of three human and two mouse homologues of GABA(A) receptor-associated protein, *Genomics* 74 (2001) 408–413.
- [6] V. Mansuy-Schlick, F. Tolle, R. Delage-Mourroux, A. Fraichard, P.Y. Risold, M. Jouvenot, Specific distribution of gabarap, *gac1/gabarap* Like 1, *gate16/gabarap* Like 2, *lc3* messenger RNAs in rat brain areas by quantitative real-time PCR, *Brain Res.* 1073–1074 (2006) 83–87.
- [7] F. Tolle, P.Y. Risold, V. Mansuy-Schlick, E. Rossi, M. Boyer-Guittaut, A. Fraichard, M. Jouvenot, Specific regional distribution of *gac1* mRNAs in adult rat central nervous system, *Brain Res.* 1210 (2008) 103–115.
- [8] V. Mansuy, W. Boireau, A. Fraichard, J.L. Schlick, M. Jouvenot, R. Delage-Mourroux, GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABA(A) receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 639–648.
- [9] C. Chen, J.G. Li, Y. Chen, P. Huang, Y. Wang, L.Y. Liu-Chen, GEC1 interacts with the kappa opioid receptor and enhances expression of the receptor, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7983–7993.
- [10] Y. Chen, C. Chen, E. Kotsikorou, D.L. Lynch, P.H. Reggio, L.Y. Liu-Chen, GEC1-kappa opioid receptor binding involves hydrophobic interactions: GEC1 has chaperone-like effect, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 1673–1685.
- [11] C. Chen, Y. Wang, P. Huang, L.Y. Liu-Chen, Effects of C-terminal modifications of GEC1 and GABARAP, two microtubules-associated proteins, on kappa opioid receptor expression, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 15106–15115.
- [12] T. Nakamura, T. Hayashi, Y. Nasu-Nishimura, F. Sakaue, Y. Morishita, T. Okabe, S. Ohwada, K. Matsuura, T. Akiyama, PX-RICS mediates ER-to-Golgi transport of the N-cadherin/beta-catenin complex, *Genes Dev.* 22 (2008) 1244–1256.

- [13] C. Schnack, K.M. Danzer, B. Hengeler, F. Gillardon, Protein array analysis of oligomerization-induced changes in alpha-synuclein protein-protein interactions points to an interference with Cdc42 effector proteins, *Neuroscience* 154 (2008) 1450–1457.
- [14] M.G. Mameza, J.M. Lockard, E. Zamora, M. Hillefors, Z.S. Lavina, B.B. Kaplan, Characterization of the adaptor protein ARH expression in the brain and ARH molecular interactions, *J. Neurochem.* 103 (2007) 927–941.
- [15] C. Nemos, V. Mansuy, S. Vernier-Magnin, A. Fraichard, M. Jouvenot, R. Delage-Mourroux, Expression of *gec1/GABARAPL1* versus *GABARAP* mRNAs in human: predominance of *gec1/GABARAPL1* in the central nervous system, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 119 (2003) 216–219.
- [16] A. Berthier, S. Seguin, A.J. Sascio, J.Y. Bobin, G. De Laroche, J. Datchary, S. Saez, C. Rodriguez-Lafrasse, F. Tolle, A. Fraichard, M. Boyer-Guittaut, M. Jouvenot, R. Delage-Mourroux, F. Descotes, High expression of *gabarap1* is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer, *Br. J. Cancer* 102 (2010) 1024–1031.
- [17] F.Z. Chakrama, S. Seguin-Py, J.N. Le Grand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot, M. Boyer-Guittaut, *GABARAPL1 (GEC1)* associates with autophagic vesicles, *Autophagy* 6 (2010) 1–11.
- [18] V.M. Betin, J.D. Lane, Caspase cleavage of Atg4D stimulates *GABARAP-L1* processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis, *J. Cell. Sci.* 122 (2009) 2554–2566.
- [19] S. Pankiv, T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy, T. Johansen, p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 24131–24145.
- [20] K.B. Larsen, T. Lamark, A. Overvatn, I. Harneshaug, T. Johansen, G. Bjorkoy, A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1, *Autophagy* 6 (2010) 784–793.
- [21] J.F. Rual, K. Venkatesan, T. Hao, T. Hirozane-Kishikawa, A. Dricot, N. Li, G.F. Berriz, F.D. Gibbons, M. Dreze, N. Ayivi-Guedehoussou, N. Klitgord, C. Simon, M. Boxem, S. Milstein, J. Rosenberg, D.S. Goldberg, L.V. Zhang, S.L. Wong, G. Franklin, S. Li, J.S. Albal, J. Lim, C. Fraughton, E. Llamas, S. Cevik, C. Bex, P. Lamesch, R.S. Sikorski, J. Vandenhaute, H.Y. Zoghbi, A. Smolyar, S. Bosak, R. Sequerra, L. Doucette-Stamm, M.E. Cusick, D.E. Hill, F.P. Roth, M. Vidal, Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network, *Nature* 437 (2005) 1173–1178.
- [22] I. Novak, V. Kirkin, D.G. McEwan, J. Zhang, P. Wild, A. Rozenknop, V. Rogov, F. Lohr, D. Popovic, A. Occhipinti, A.S. Reichert, J. Terzic, V. Dotsch, P.A. Ney, I. Dikic, Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance, *EMBO Rep.* 11 (2010) 45–51.
- [23] F. Brischox, D. Fellmann, P.Y. Risold, Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic 'MCH area' hypothesis, *Eur. J. Neurosci.* 13 (2001) 1733–1744.
- [24] P.M. Schenk, S. Baumann, R. Mattes, H.H. Steinbiss, Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs, *Biotechniques* 19 (1995) 196–198 200.
- [25] J. Mohrluder, Y. Hoffmann, T. Stangler, K. Hanel, D. Willbold, Identification of clathrin heavy chain as a direct interaction partner for the gamma-aminobutyric acid type A receptor associated protein, *Biochemistry* 46 (2007) 14537–14543.
- [26] D. Picard, Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 1640–1648.
- [27] R. Zhao, M. Davey, Y.C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, W.A. Houry, Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone, *Cell* 120 (2005) 715–727.
- [28] A. Gimenez Ortiz, J. Montalar Salcedo, Heat shock proteins as targets in oncology, *Clin. Transl. Oncol.* 12 (2010) 166–173.
- [29] P. Gass, H. Schroder, P. Prior, M. Kiessling, Constitutive expression of heat shock protein 90 (HSP90) in neurons of the rat brain, *Neurosci. Lett.* 182 (1994) 188–192.
- [30] C. Behrends, M.E. Sowa, S.P. Gygi, J.W. Harper, Network organization of the human autophagy system, *Nature* 466 (2010) 68–76.
- [31] F. Chiacchiera, A. Matrone, E. Ferrari, G. Ingravallo, G. Lo Sasso, S. Murzilli, M. Petruzzelli, L. Salvatore, A. Moschetta, C. Simone, p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 1203–1214.
- [32] B.S. Blagg, T.D. Kerr, Hsp90 inhibitors: small molecules that transform the Hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation, *Med. Res. Rev.* 26 (2006) 310–338.
- [33] L. Neckers, Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents, *Trends Mol. Med.* 8 (2002) S55–S61.
- [34] J. Lewis, A. Devin, A. Miller, Y. Lin, Y. Rodriguez, L. Neckers, Z.G. Liu, Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10519–10526.
- [35] J.T. Kittler, P. Delmas, J.N. Jovanovic, D.A. Brown, T.G. Smart, S.J. Moss, Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons, *J. Neurosci.* 20 (2000) 7972–7977.
- [36] D. Herring, R. Huang, M. Singh, L.C. Robinson, G.H. Dillon, N.J. Leidenheimer, Constitutive GABAA receptor endocytosis is dynamin-mediated and dependent on a dileucine AP2 adaptin-binding motif within the beta 2 subunit of the receptor, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 24046–24052.
- [37] A.S. Sreedhar, E. Kalmar, P. Csermely, Y.F. Shen, Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance, *FEBS Lett.* 562 (2004) 11–15.
- [38] R.S. Gupta, Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species, *Mol. Biol. Evol.* 12 (1995) 1063–1073.
- [39] P.C. Echeverría, A. Bernthaler, P. Dupuis, B. Mayer, D. Picard, An interaction network Predicted from Public data as a discovery Tool: application to the Hsp90 molecular chaperone Machine, *PLoS One* 6 (2011) e26044.
- [40] C. Prodromou, S.M. Roe, R. O'Brien, J.E. Ladbury, P.W. Piper, L.H. Pearl, Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone, *Cell* 90 (1997) 65–75.
- [41] S. Sharp, P. Workman, Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status, *Adv. Cancer Res.* 95 (2006) 323–348.
- [42] M.P. Goetz, D.O. Toft, M.M. Ames, C. Erlichman, The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy, *Ann. Oncol.* 14 (2003) 1169–1176.
- [43] S.Z. Usmani, R. Bona, Z. Li, 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer—from bench to bedside, *Curr. Mol. Med.* 9 (2009) 654–664.
- [44] U. Banerji, Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 9–14.
- [45] W. Yang, J. Monroe, Y. Zhang, D. George, E. Bremer, H. Li, Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells, *Cancer Lett.* 243 (2006) 217–227.
- [46] Z.Y. Tang, Y.L. Wu, S.L. Gao, H.W. Shen, Effects of the proteasome inhibitor bortezomib on gene expression profiles of pancreatic cancer cells, *J. Surg. Res.* 145 (2008) 111–123.
- [47] W.K. Wu, Y.C. Wu, L. Yu, Z.J. Li, J.J. Sung, C.H. Cho, Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 (2008) 258–263.
- [48] W.X. Ding, H.M. Ni, W. Gao, T. Yoshimori, D.B. Stolz, D. Ron, X.M. Yin, Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability, *Am. J. Pathol.* 171 (2007) 513–524.
- [49] M. Milani, T. Rzymiski, H.R. Mellor, L. Pike, A. Bottini, D. Generali, A.L. Harris, The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib, *Cancer Res.* 69 (2009) 4415–4423.
- [50] V.I. Korolchuk, F.M. Menzies, D.C. Rubinsztein, A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system, *Autophagy* 5 (2009) 862–863.
- [51] I. Jariel-Encontre, G. Bossis, M. Piechaczyk, Ubiquitin-independent degradation of proteins by the proteasome, *Biochim. Biophys. Acta* 1786 (2008) 153–177.
- [52] Z. Gao, N. Gammoh, P.M. Wong, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, X. Jiang, Processing of autophagic protein LC3 by the 20S proteasome, *Autophagy* 6 (2010) 126–137.
- [53] Z.W. Chen, C.S. Chang, T.A. Leil, R.W. Olsen, C-terminal modification is required for GABARAP-mediated GABA(A) receptor trafficking, *J. Neurosci.* 27 (2007) 6655–6663.



## COMMUNICATIONS ORALES

- 1) **Le Grand JN**, Bon K, Fraichard A, Zhang J, Jouvenot M, Risold PY, Boyer-Guittaut M, DelageMourroux R (2012) The study of the autophagic protein: GABARAPL1. *Société de Biologie de Besançon*. Besançon, France. 20 décembre 2012
  
- 2) **Le Grand JN**, Bôle-Richard E, Bon K, Fraichard A, Zhang J, Jouvenot M, Risold PY, Boyer-Guittaut M, DelageMourroux R (2012) The study of the autophagic protein: GABARAPL1. *Club Francophone de l'Autophagie (CFATG)*. La Grande Motte, France. 23-25 septembre 2012
  
- 3) **Le Grand JN**, Bon K, Fraichard A, Zhang J, Jouvenot M, Risold PY, Boyer-Guittaut M, DelageMourroux R (2012) The study of the autophagic protein: GABARAPL1. *Forum des Jeunes Chercheurs*. Besançon, France 6-7 septembre 2012





## COMMUNICATIONS AFFICHEES

- 1) **Le Grand JN**, Risold PY, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M, DelageMourroux R (2011) GABARAPL1 expression in the brain and in neurodegenerative conditions. *Club Francophone de l'Autophagie (CFATG)*. Lyon, France 6-7 octobre 2011
  
- 2) **Le Grand JN**, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M, DelageMourroux R (2010) The role of GABARAPL1, a new autophagic protein, in neurodegenerative diseases. *Forum des Jeunes Chercheurs*. Dijon, France 16-17 juin 2011
  
- 3) **Le Grand JN**, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M, DelageMourroux R (2010) The role of GABARAPL1, a new autophagic protein, in neurodegenerative diseases. *Harden Conference-Autophagy : from Molecules to Disease*. Cirencester, Angleterre. 8-12 septembre 2010



Le Grand J.N\*, Risold P.Y., Jouvenot M., Boyer-Guittaut M. and Delage-Mourroux R.

Equipe Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central, Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, UFR-Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté, Besançon, France  
E-mail: j.n.legrand@gmail.com

## Introduction

**GABARAPL1**  
• GABARAPL1 est un membre de la famille ATG8 (compris de LC3A/B, GABARAP, GATE-16 et GABARAPL1)

• GABARAPL1 interagit, comme GABARAP, avec le sous-unité  $\gamma 2$  de le récepteur GABA<sub>A</sub> et le cytosquelette (Mansuy et al. 2004)

• L'ARNm de *Gabarapl1* est plus fortement exprimé dans le système nerveux centrale, comparé aux autres membres de la famille GABARAP (Mansuy-Schlick et al. 2006)

• GABARAPL1 est impliqué dans l'autophagie (Chakrama et al. 2010)

### AUTOPHAGIE

• un processus de dégradation in vrac fortement contrôlé dans les cellules et régulé par les ATGs (autophagy-related proteins)

• utilisé par les cellules pour dégradé des protéines malifiques et des agrégats de protéines

• un niveau d'autophagie dérégulé peut produire un type de mort cellulaire programmé appelé la mort autophagique

### La Maladie de Parkinson

• caractériser par des symptômes de mouvements comme tremblements, la rigidité, les mouvements lents

• est un résultat de la mort des neurones dopaminergiques dans le *Substantia nigra pars compacta*

• la présence d'inclusions contenant l'alpha-synucléine appelé les corps Lewy

### Buts:

- Étudier l'expression et rôle de GABARAPL1 dans le cerveau
- Déterminer l'implication de GABARAPL1 dans le processus d'autophagie à l'égard des maladies neurodégénératives

expression d'ARNm *gabarapl1*

la protéine GABARAPL1

ubiquitaire, fortement exprimé dans le système nerveux centrale

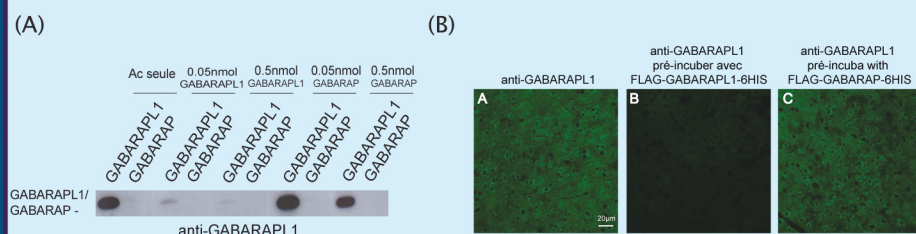
impliquée dans le processus d'autophagie

impliquée dans la dégradation de protéines visées dans le cerveau?

\* (Novak et al. 2010) \*\* (Pankiv et al. 2007)

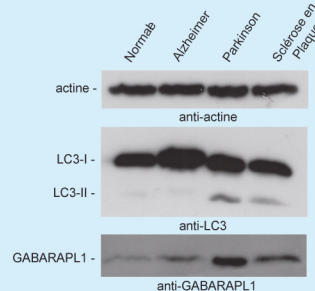
## Résultats

### Identification d'un Anticorps Spécifique à GABARAPL1



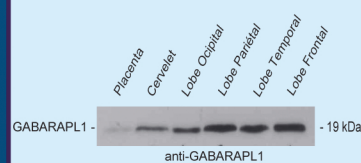
**Figure 1: Identification d'un Anticorps Spécifique à GABARAPL1.** (A) L'analyse par Western blot d'une expérience de peptides compétitives. Un anticorps anti-GABARAPL1 a été pré-incubé avec soit la protéine recombinante purifiée Flag-GABARAPL1-6His ou Flag-GABARAP-6His pour 1h au volume indiqué avant incubation avec une membrane contenant 100ng de Flag-GABARAPL1-6His ou Flag-GABARAP-6His. (B) L'analyse immunohistochimique du cerveau murine avec anti-GABARAPL1. L'Ac primaire a été incubé dans un soit PBST seule, 0.5nmol Flag-GABARAP-6His ou Flag-GABARAPL1-6His pour 2hrs avant incubation sur des coupes de cerveau de souris pour la nuit.

### GABARAPL1 est Surexprimé dans les Maladies Neurodégénératives



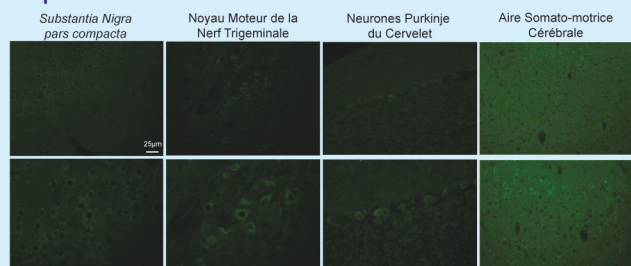
**Figure 2: GABARAPL1 est surexprimé dans les maladies neurodégénératives.** 50µg de lysats de protéines cérébrales de divers patients souffrants d'une maladie neurodégénérative ont été analysés via l'analyse de western blot avec des anticorps contre Actine, LC3, et GABARAPL1.

### L'Expression de GABARAPL1 dans le Système Nerveux Centrale



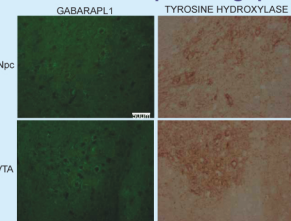
**Figure 3: L'Expression de GABARAPL1 dans le système nerveux centrale.** Une membrane contenant 50µg de lysat de tissu humain par puits (Biochain) a été incubé avec un anticorps anti-GABARAPL1.

### L'Expression de GABARAPL1 dans les Neurones Somato-motrices



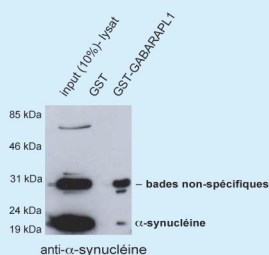
**Figure 4: L'Expression de GABARAPL1 dans les neurones somato-motrices.** Marquage immunohistochimique du tissu de cerveau de souris avec anti-GABARAPL1. Expression de la protéine GABARAPL1 est observé principalement dans les neurones avec une distribution diffus dans le cytoplasme et un fort marquage de points granulaires dans diverses régions du cerveau et particulièrement dans les neurones impliquées dans les fonctions somato-motrices.

### L'Expression de GABARAPL1 dans les Neurones Dopaminergiques



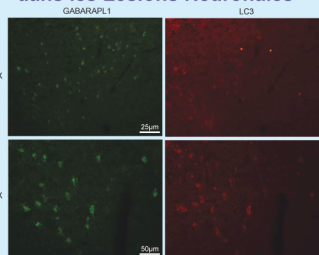
**Figure 5: L'Expression de GABARAPL1 dans les neurones dopaminergiques.** L'analyse immunohistochimique du tissu de cerveau de souris avec anti-GABARAPL1 et anti-Tyrosine Hydroxylase (un marqueur de neurones dopaminergiques) démontre une co-localisation de GABARAPL1 avec les neurones qui produisent la dopamine. SNpc= *Substantia nigra pars compacta*, VTA= aire tegmentale ventrale.

### GABARAPL1 Interagit avec l' $\alpha$ -Synucléine



**Figure 6: GABARAPL1 interagit avec l'  $\alpha$ -synucléine.** Le lysat d'un cerveau de souris complet a été ajouté à GST- ou GST-GABARAPL1 pré-incubé avec des billes glutathione-agarose pour 2hrs. L'analyse de Western blot des protéines éluées avec anti- $\alpha$ -synucléine démontre une interaction spécifique entre GABARAPL1 et  $\alpha$ -synucléine.

### Le Surexpression de GABARAPL1 et LC3 dans les Lésions Neuronales



**Figure 7: Le surexpression de GABARAPL1 et LC3 dans les lésions neuronales.** L'analyse immunohistochimique avec anti-GABARAPL1 d'un cerveau de rat lésionner démontre un surexpression de cette protéine dans les neurones autour d'une lésion après dommage mécanique.

## Conclusions

- GABARAPL1 est surexprimé dans les cerveaux affectés par les maladies neurodégénératives
- la protéine GABARAPL1 est surexprimé dans diverses régions du cerveau, et particulièrement dans les neurones impliqués dans des fonctions somato-motrices
- GABARAPL1 co-localise avec les neurones qui expriment le TH (dopaminergique) et interagit avec l'  $\alpha$ -synucléine
- GABARAPL1 est surexprimé dans les neurones autour d'une lésion mécanique

## Perspectives

• Donnée la forte expression de GABARAPL1 dans le SNC, sa surexpression dans les maladies neurodégénératives, et son rôle dans le processus d'autophagie, les études à suivre vont focaliser sur les questions suivantes:

- 1) Quelle est le rôle de GABARAPL1 dans la réparation des neurones dégénérés?
- 2) Quelle est la signification fonctionnel de l'interaction entre GABARAPL1 et les protéines associées avec les maladies neurodégénératives?
- 3) Est-ce que GABARAPL1 peut protéger les neurones contre l'agrégation des protéines via son rôle dans l'autophagie?





Le Grand J.N\*, Risold P.Y., Jouvenot M., Boyer-Guittaut M. and Delage-Mourroux R.

Equipe Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central, Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, UFR-Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté, Besançon, France  
E-mail: j.n.legrand@gmail.com

## Introduction

**GABARAPL1**  
• GABARAPL1 is a member of the ATG8 family (comprised of LC3A/B, GABARAP, GATE-16 and GABARAPL1)

• GABARAPL1 interacts, like GABARAP, with the  $\gamma 2$  subunit of GABA<sub>A</sub> receptor and cytoskeleton elements (Mansuy *et al.* 2004)

• GABARAPL1 mRNA is more highly expressed in the central nervous system, compared to other members of the GABARAP family (Mansuy-Schilck *et al.* 2006)

• GABARAPL1 is involved in the autophagic process (Chakrama *et al.* 2010)

### AUTOPHAGY

• a highly controlled bulk degradation process in cells regulated by the ATGs (autophagy-related proteins)

• utilized by cells to degrade harmful proteins and protein aggregates

• an uncontrolled level of autophagy can lead to a type of programmed cell death termed autophagic cell death

### Parkinson Disease

• characterized by movement-related symptoms such as shaking, rigidity, slowness of movement

• results from the death of dopaminergic neurons in the *Substantia Nigra pars compacta*

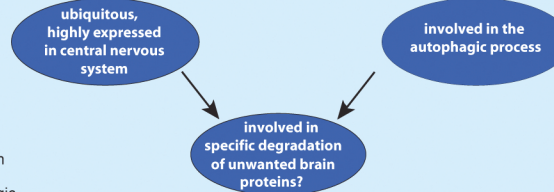
• presence of alpha-synuclein-containing neuronal inclusions called Lewy bodies

### Aims:

- Study the expression and role of GABARAPL1 in the brain
- Determine the implication of GABARAPL1 in the autophagic process with respect to neurodegenerative diseases

*gabarapl1* mRNA expression

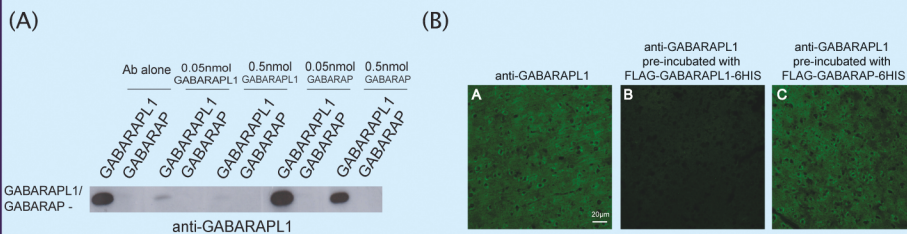
GABARAPL1 protein



\* (Novak *et al.* 2010) \*\* (Pankiv *et al.* 2007)

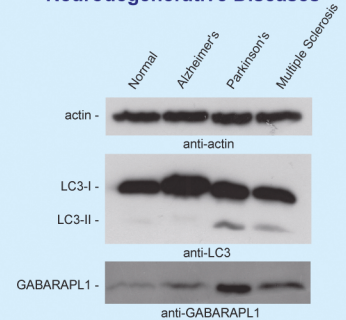
## Results

### Identification of a GABARAPL1 Specific Antibody



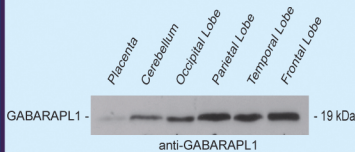
**Figure 1: Identification of a GABARAPL1 specific antibody.** (A) Western blot analysis of competing peptide experiment. Anti-GABARAPL1 Ab was pre-incubated with either purified Flag-GABARAPL1-6His or Flag-GABARAP-6His recombinant proteins for 1h at the indicated volume prior to incubation with a membrane containing 100ng of Flag-GABARAPL1-6His or Flag-GABARAP-6His. Primary Ab was incubated in either PBST alone, 0.5nmol Flag-GABARAP-6His or Flag-GABARAPL1-6His for 2hrs before incubating on mouse brain sections overnight.

### GABARAPL1 Expression is Upregulated in Neurodegenerative Diseases



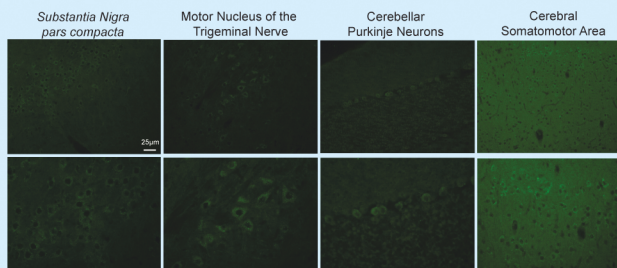
**Figure 2: GABARAPL1 expression is upregulated in neurodegenerative diseases.** 50µg of brain protein lysate from various neurodegenerative disease patients was analysed via western blot analysis with antibodies against Actin, LC3, and GABARAPL1.

### GABARAPL1 Expression in the Central Nervous System



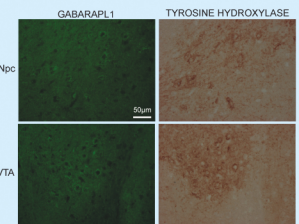
**Figure 3: GABARAPL1 expression in the central nervous system.** Western blot membrane containing 50µg of human tissue lysate per lane (Biochain) was blotted using an anti-GABARAPL1 antibody.

### GABARAPL1 Expression in Somatomotor Neurons



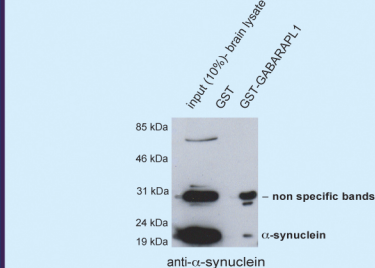
**Figure 4: GABARAPL1 expression in somatomotor neurons.** Immunohistochemical staining of mouse brain tissue with anti-GABARAPL1. GABARAPL1 protein expression is found predominantly in neurons with a diffuse cytoplasmic distribution dotted with stronger granular expression in various brain regions and in particular in neurons involved in somatomotor function.

### GABARAPL1 Expression in Dopaminergic Neurons



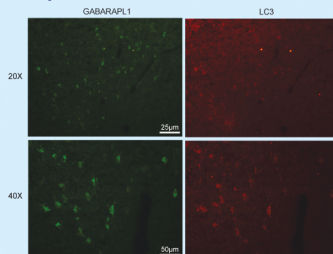
**Figure 5: GABARAPL1 expression in dopaminergic neurons.** Immunohistochemical analysis of mouse brain tissue with anti-GABARAPL1 and anti-Tyrosine Hydroxylase (a marker of dopaminergic neurons) revealed a high expression pattern of GABARAPL1 in dopaminergic producing neurons. SNpc= Substantia Nigra pars compacta, VTA= ventral tegmental area.

### GABARAPL1 Interacts with $\alpha$ -Synuclein



**Figure 6: GABARAPL1 interacts with  $\alpha$ -synuclein.** Whole mouse brain lysate was added to GST- or GST-GABARAPL1 pre-incubated glutathione agarose beads for 2hrs. Western blot analysis of eluted proteins with anti- $\alpha$ -synuclein reveals a specific interaction between GABARAPL1 and  $\alpha$ -synuclein.

### Upregulation of GABARAPL1 and LC3 Expression in Neuronal Lesions



**Figure 7: Upregulation of GABARAPL1 and LC3 expression in neuronal lesions.** Immunohistochemical analysis of lesioned rat brain tissue with anti-GABARAPL1 revealed an upregulation of this protein in neurons around a lesioned area after physical damage.

## Conclusion

- GABARAPL1 is upregulated in brains affected by neurodegenerative diseases
- GABARAPL1 protein is highly expressed in various brain regions, specifically in neurons involved in somatomotor function
- GABARAPL1 co-localizes with TH-positive (dopaminergic) neurons and physically interacts with  $\alpha$ -synuclein
- GABARAPL1 is upregulated in the neurons around a physical lesion

## Perspectives

- Given the strong expression of GABARAPL1 in the CNS, its upregulation in neurodegenerative diseases, and its role in the autophagic process, future studies will focus on the following questions:

- 1) What is the role of GABARAPL1 in repairing and degenerating neurons?
- 2) What is the functional significance of the interaction between GABARAPL1 and neurodegenerative disease associated proteins?
- 3) Can GABARAPL1 act to protect neurons from protein aggregation via its role in autophagy?





Le Grand J.N\*, Risold P.Y., Jouvenot M., Boyer-Guittaut M. and Delage-Mourroux R.

Equipe Estrogènes, Expression Génique et Pathologies du Système Nerveux Central, Laboratoire de Biochimie, EA3922, IFR133, UFR-Sciences et Techniques, Université de Franche-Comté, Besançon, France  
E-mail: j.n.legrand@gmail.com

## Introduction

- GABARAPL1 is a member of the GABARAP family (GABA<sub>A</sub> receptor associated protein)
- GABARAPL1 interacts, like GABARAP, with the  $\gamma_2$  subunit of GABA<sub>A</sub> receptor and cytoskeleton elements
- Gabarapl1* mRNA is more highly expressed in the central nervous system, compared to other members of the GABARAP family (Mansuy-Schlick *et al.* 2006)
- GABARAPL1 is involved in the autophagic process (Chakrama *et al.* 2010)

### Aims:

- Study the role of GABARAPL1 in the brain
- Determine the implication of GABARAPL1 in the autophagic process with respect to neurodegenerative diseases

*gabarapl1* mRNA expression

GABARAPL1 protein

ubiquitous, highly expressed in central nervous system

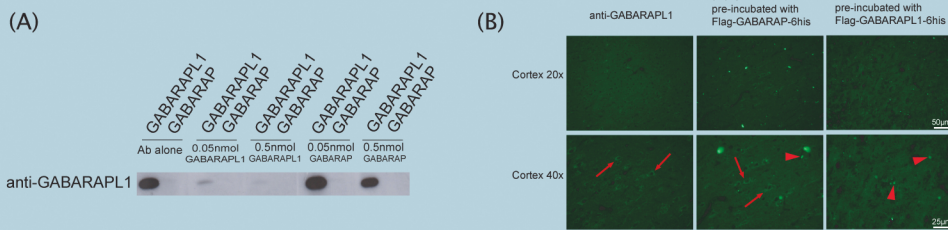
involved in autophagy, associates with Nix\* and p62\*\* for degradation

involved in specific degradation of unwanted brain proteins?

\* (Novak *et al.* 2010) \*\* (Pankiv *et al.* 2007)

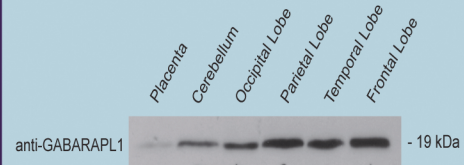
## Results

### Identification of a GABARAPL1 Specific Antibody



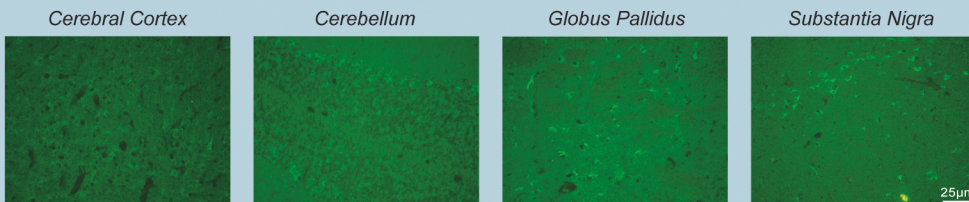
**Figure 1: Identification of a GABARAPL1 specific antibody.** (A) Western blot analysis of blocking peptide experiment. Anti-GABARAPL1 Ab was pre-incubated with either purified Flag-GABARAPL1-6his or Flag-GABARAP-6his recombinant proteins for 1h at the indicated volume prior to incubation with a membrane containing 100ng of Flag-GABARAPL1-6his or Flag-GABARAP-6his. (B) Immunohistochemical analysis of rat brain tissue with anti-GABARAPL1. Primary Ab was incubated in either PBST alone, 0.5nmol Flag-GABARAP-6his or Flag-GABARAPL1-6his for 2hrs before incubating on rat brain sections overnight. Specific staining (red arrow) can be observed in panels corresponding to Ab alone control and Ab incubated with GABARAP (left and center columns). Artifacts of pre-incubation (protein-Ab complexes) can be seen in both experimental columns (red arrowheads).

### GABARAPL1 is Expressed in Various Brain Regions



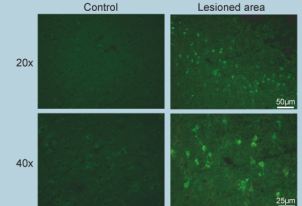
**Figure 2: GABARAPL1 is expressed in various brain regions.** Western blot membrane containing 50 ug of tissue lysate per lane (Biochain) was blotted using an anti-GABARAPL1 antibody.

### GABARAPL1 Expression Patterns in the Brain



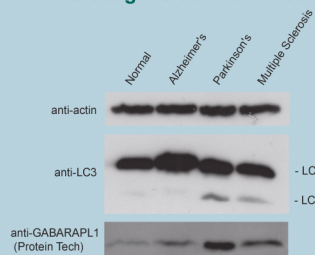
**Figure 3: GABARAPL1 expression patterns in the brain.** Immunohistochemical staining of mouse brain tissue with anti-GABARAPL1. GABARAPL1 protein expression is found predominantly in neurons with a diffuse cytoplasmic distribution dotted with stronger granular expression in various brain regions. Shown above is staining in cortical neurons, the purkinje neurons of the cerebellum, pallidial neurons and neurons of the substantia nigra.

### Upregulation of GABARAPL1 Expression in Neuronal Lesions



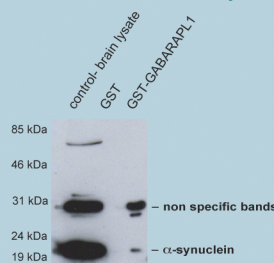
**Figure 4: Upregulation of GABARAPL1 expression in neuronal lesions.** Immunohistochemical analysis of lesioned rat brain tissue with anti-GABARAPL1 revealed an upregulation of this protein in neurons around a lesioned area after physical damage.

### GABARAPL1 Expression is Upregulated in Neurodegenerative Diseases



**Figure 5: GABARAPL1 expression is upregulated in neurodegenerative diseases.** 50ug of brain protein lysate from various neurodegenerative disease patients was analysed via western blot analysis with antibodies against Actin, LC3, and GABARAPL1.

### GABARAPL1 Interacts with $\alpha$ -Synuclein



**Figure 6: GABARAPL1 interacts with  $\alpha$ -synuclein.** Whole mouse brain lysate was added to GST- or GST-GABARAPL1 pre-incubated glutathione agarose beads for 2hrs. Western blot analysis of eluted proteins with anti- $\alpha$ -synuclein reveals a specific interaction between GABARAPL1 and  $\alpha$ -synuclein.

## Conclusion

- GABARAPL1 protein, like its mRNA, is highly expressed in various brain regions, specifically in neurons
- GABARAPL1 is upregulated in damaged neurons
- GABARAPL1 is upregulated in brains affected by neurodegenerative diseases and physically interacts with  $\alpha$ -synuclein

## Perspectives

- Given the strong expression of GABARAPL1 in the CNS, its upregulation in neurodegenerative diseases, and its role in the autophagic process, future studies will focus on the following questions:

- 1) What is the role of GABARAPL1 in repairing and degenerating neurons?
- 2) What is the functional significance of the interaction between GABARAPL1 and neurodegenerative disease associated proteins?
- 3) Can GABARAPL1 act to protect neurons from protein aggregation via its role in autophagy?





## **RESUMES**



Le gène *gac1/gabarapl1* (*glandular epithelial cell 1/gabarap like 1*), identifié au sein de notre équipe, est un gène apparenté à la famille *atg8* (*autophagy related gene 8*) et la sous-famille *gabapap* (*GABA<sub>A</sub> receptor associated protein*) incluant les gènes *gabapap*, *gabapapl1*, *gabapapl2* et *gabapapl3*. Les protéines codées par ces gènes présentent de très fortes identités de séquences et des structures similaires. Le gène *gabapapl1* est exprimé préférentiellement dans le SNC dans lequel il est le transcrit de la famille *atg8* le plus fortement exprimé. Des études fonctionnelles ont démontré que la protéine GABARAPL1 intervient dans le trafic intracellulaire de récepteurs, et plus particulièrement du récepteur GABA<sub>A</sub> et du récepteur aux  $\kappa$ -opioïdes, via son interaction avec les microtubules. Cependant, le rôle de cette protéine ne se limite probablement pas au seul transport de ces récepteurs. Notre équipe a d'ailleurs récemment démontré que GABARAPL1 est impliquée dans le processus d'autophagie, un mécanisme de dégradation cellulaire.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai eu trois objectifs : (1) l'étude de la spécificité d'anticorps anti-GABARAPL1 commerciaux disponibles, (2) la cartographie détaillée de l'expression de GABARAPL1 dans le cerveau murin et (3) l'étude de la surexpression de GABARAPL1 dans un modèle neuronal *in vitro* en conditions de stress mitochondriaux.

Etant donné la forte homologie entre GABARAPL1 et GABARAP, aucun anticorps spécifique commercial n'était disponible lorsque nous avons débuté mon projet de recherche. Nous avons donc, dans un premier temps, étudié la spécificité des différents anticorps commerciaux anti-GABARAPL1 disponibles et identifié un anticorps capable de détecter de façon spécifique cette protéine *in vitro* et *in vivo*.

Grâce à cet anticorps spécifique, nous avons ensuite entrepris l'étude de l'expression *in vivo* de la protéine GABARAPL1 dans le SNC de souris chez l'adulte et au cours du développement embryonnaire. Nous avons ainsi démontré que GABARAPL1 est exprimée dans les neurones immatures et les fibres neuronales à partir du 11<sup>e</sup> jour de développement et son expression augmente progressivement jusqu'à un taux maximal observé chez l'adulte. Chez l'adulte, GABARAPL1 est exprimée uniquement dans les neurones et plus particulièrement dans ceux impliqués dans les fonctions motrices et neuroendocrines. De plus, nous avons noté que le marquage ponctiforme de GABARAPL1 co-localise partiellement avec p62 dans des cultures neuronales primaires, confirmant son association aux vésicules autophagiques *in vivo*.

Pour caractériser la fonction cellulaire de GABARAPL1, nous avons surexprimé cette protéine dans des cellules neuronales SK-N-BE(2). L'étude de ce nouveau modèle neuronal a montré que la surexpression de DsRed-GABARAPL1 semble potentialiser la réponse autophagique des cellules, ce qui permet une induction plus précoce suite à des traitements induisant l'autophagie. De plus, la surexpression de GABARAPL1 inhibe la mort des cellules soumises à des stress ciblant les mitochondries (CCCP), ce qui suggère que GABARAPL1 pourrait protéger les neurones contre certains stress aggravant la progression des maladies neurodégénératives.

L'ensemble de ces travaux a permis d'identifier un outil spécifique à l'immunodétection de GABARAPL1, de cartographier son expression dans le SNC murin au cours du développement et chez l'adulte et finalement, de démontrer un rôle protecteur de GABARAPL1 contre la mort neuronale induite par un stress mitochondrial.

**Mots clés :** GEC1/GABARAPL1 ; GABARAP ; système nerveux central ; macroautophagie ; mitophagie

The *gec1/gabarapl1* gene (*glandular epithelial cell 1/gabarap like 1*), identified within our team, is a gene related to the *atg8* (*autophagy related gene 8*) family and the *gabapap* (*GABA<sub>A</sub> receptor-associated protein*) subfamily of genes including *gabapap*, *gabapapl1*, *gabapapl2* and *gabapapl3*. The protein products of these genes present a very strong sequence identity and are structurally similar. The *gabapapl1* gene is expressed preferentially in the central nervous system, in which it is the most highly expressed transcript of the *atg8* family. Functional studies have shown that the GABARAPL1 protein is involved in intracellular trafficking of receptors, in particular the GABA<sub>A</sub> receptor and the κ-opioid receptor, *via* its interaction with cytoskeletal elements. The role of this protein, however, is clearly not limited to the transport. Our team has also recently shown that GABARAPL1 is involved in the autophagic process, a cellular degradation mechanism.

My thesis objectives were three-tiered: (1) the study of the specificity of anti-GABARAPL1 antibodies, (2) the detailed mapping of GABARAPL1 expression in the mouse brain and (3) the study of GABARAPL1 overexpression under conditions of mitochondrial stress in an *in vitro* neuronal model.

Given the high homology between GABARAPL1 and GABARAP, no commercially available specific antibody was available when we started my research project. As such, we conducted a study on the specificity of different commercially available anti-GABARAPL1 antibodies and identified an antibody that specifically recognized this protein *in vitro* and *in vivo* experiments.

With this specific antibody, we then undertook a study of the *in vivo* expression of the GABARAPL1 protein in the adult mouse central nervous system and throughout embryonic development. In this study, we demonstrate that GABARAPL1 is expressed in immature neurons and neural fibers in the embryo from the 11th day of embryonic development and its expression gradually increases to a maximum in adults. In adults, GABARAPL1 is expressed in neurons, in particular, in those involved in motor control and neuroendocrine functions. The punctate labeling of GABARAPL1 partially co-localizes with p62 in primary neuronal cultures, confirming its association with autophagic vesicles *in vivo*.

To characterize the cellular function of GABARAPL1, we overexpressed this protein in neuronal SK-N-BE (2) cells. The study of our neuronal cell model revealed

that overexpression of DsRed-GABARAPL1 appears to prime cells for autophagy, resulting in an earlier induction of autophagy after treatments that induce this processes. In addition, overexpression of this protein delays cell death in a CCCP-induced mitochondrial stress model, suggesting that GABARAPL1 could protect neurons against certain stresses known to contribute to the development of neurodegenerative diseases.

Together, this work has identified a specific tool for the immunodetection of GABARAPL1, produced a detailed map of GABARAPL1 expression in the developing and adult murine central nervous system and finally, demonstrated a protective role for GABARAPL1 against neuronal death induced by mitochondrial stress.

**Keywords** : GEC1/GABARAPL1; GABARAP, central nervous system; macroautophagy; mitophagy