



# Idiopathische progressieve familiale intrahepatische cholestase

Nieuwe genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van PFIC

M.G. (Mark) Lieverse

S3353249

Medische Celbiologie Researchcursus

prof. dr. S.C.D. van Ijzendoorn

10-5-2020

## Abstract

Progressieve familiale intrahepatische cholestase (PFIC) is de benaming voor een groep van zeldzame leverziekten die autosomaal recessief worden overgeërfd. De afgelopen decennia is er vooral veel bekend gekomen over de PFIC 1-3 varianten. Deze worden veroorzaakt door afwijkingen in FIC 1, BSEP en MDR3. Echter, blijken er ook steeds meer onderzoeken in de literatuur te verschijnen, waarin er associaties tussen PFIC en andere genen worden gemaakt. Dit worden idiopathische PFIC varianten genoemd. Voorbeelden van deze genen zijn: *MYO5B*, *AP1S1*, *SCYL1*, *VPS33B* en *VIPAS39*. In deze review worden de relaties tussen bovenstaande genen en PFIC 1-3 onderzocht. Hierbij wordt er ook gekeken naar mogelijke knooppunten in intracellulaire transportroutes. Uit de resultaten blijkt dat mutaties in de onderzochte genen kunnen leiden tot onder andere intrahepatische cholestase. Onderzoeken toonde afwijkingen in BSEP lokalisatie bij mutaties in *MYO5B*, *VPS33B* en *VIPAS39*. Daarnaast bleken er mogelijke knooppunten te zijn tussen de eiwitten die ontstaan uit *MYO5B* en *VPS33B/VIPAS39* en tussen de eiwitten die ontstaan uit *AP1S1* en *SCYL1*. Samenvattend, coderen de genen *MYO5B*, *AP1S1*, *SCYL1*, *VPS33B* en *VIPAS39* voor eiwitten die een rol kunnen spelen bij het intracellulaire transport van de PFIC 1-3 eiwitten. De kennis die men over deze intracellulaire routes verkrijgt, kan mogelijk in de toekomst worden gebruikt voor therapeutische doeleinden.

## Inhoudsopgave

Inleiding .....	2
Resultaten .....	4
<i>MYO5B</i> .....	4
<i>AP1S1</i> .....	5
<i>SCYL1</i> .....	6
<i>VPS33B</i> & <i>VIPAS39</i> .....	7
Knooppunten genen in intracellulaire routes .....	8
Conclusie & Discussie .....	10
Literatuurlijst .....	12

## Inleiding

In de afgelopen jaren is er steeds meer bekend geworden over een zeldzame leveraandoening, genaamd progressieve familiere intrahepatische cholestase (PFIC). Het wordt autosomaal recessief overgeërfd en het wordt gekarakteriseerd door intrahepatische cholestase die zich vaak neonataal of later in de kindertijd presenteert (Morotti et al., 2011). De geschatte incidentie van PFIC ligt tussen 1/50.000 en 1/100.000 (Jacquemin, 2012). Voornamelijk PFIC 1-3 is veel over bekend. PFIC 1-3 worden geassocieerd met mutaties in genen die coderen voor hepatocellulaire transporteiwitten, die betrokken zijn bij de galformatie.

PFIC 1 ontstaat door een afwijking in het FIC 1 eiwit, wat wordt veroorzaakt door een mutatie in het *ATP8B1* gen (Morotti et al., 2011). FIC 1 afwijking wordt gekenmerkt door blijvende cholestase, jeuk en geelzucht, waarbij deze verschijnselen meestal in het eerste levensjaar ontstaan. Naast deze primaire verschijnselen, zijn er ook nog andere klinische manifestaties die kunnen ontstaan, zoals diarree, malabsorptie in combinatie met vet-oplosbare vitamine afwijkingen en groeiproblemen. De serum gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) activiteit en cholesterol concentratie zijn normaal bij deze PFIC variant, maar de serum galzuren zijn sterk verhoogd. Vaak wordt bij het onderzoek een leverbiopt genomen om tot een diagnose te komen. Clayton et al., zagen in hun onderzoek van PFIC patiënten overeenkomsten in het leverbiopt (Clayton et al., 1969). Ze zagen canaliculaire cholestase, zonder afwijking van de lobulaire architectuur. Echter, het meest specifiek voor PFIC 1 is het korrelige 'Byler gal' in de gedilateerde galcanaliculi (Morotti et al., 2011). Het is nog onduidelijk hoe een mutatie in FIC 1 zorgt voor cholestase, maar er is een hypothese dat de mutatie in *ATP8B1* indirect zorgt voor een afwijking in secretie van galzouten (Jacquemin, 2012). Zo zou deze mutatie kunnen leiden tot een verlaging van de FXR eiwitexpressie, wat leidt tot verlaging van BSEP expressie, meer galzoutsynthese en uiteindelijk galzout ophoping (Chen et al., 2004; Alvarez et al., 2004).

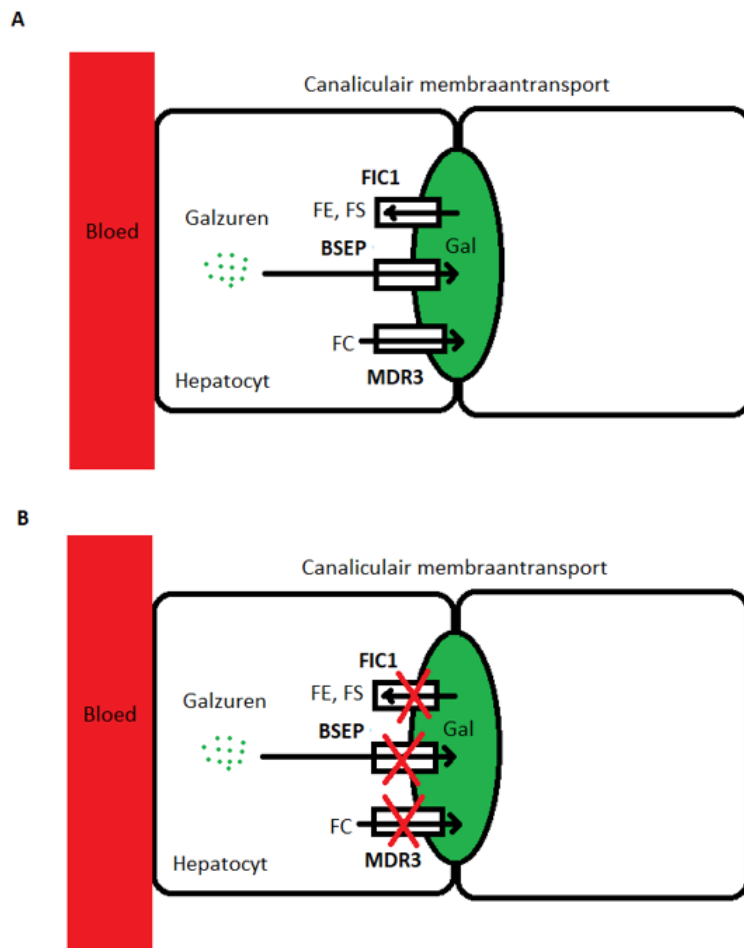
PFIC 2 wordt ook wel een BSEP ('bile salt export pump') afwijking genoemd, waarbij een mutatie in het *ABCB11* gen leidt tot een afwijkend BSEP eiwit (Morotti et al., 2011). Evenals PFIC 1, presenteert PFIC 2 zich, met een normale of lage GGT concentratie. Een verschil met PFIC 1, is dat het BSEP eiwit alleen aanwezig is in de hepatocyten, terwijl het FIC 1 eiwit ook aanwezig is in andere organen. PFIC 1 presenteert zich ook met extrahepatische symptomen, omdat het FIC 1 eiwit bijvoorbeeld ook in de pancreas aanwezig is (Jacquemin, 2012). PFIC 2 patiënten presenteren zich meestal in de neonatale periode met cholestatische geelzucht. De progressie van PFIC 2 is sneller dan PFIC 1 en snelle progressie naar levercirrose komt vaak voor. Bull et al. toonde in hun experiment aan dat er histologisch een verschil is met PFIC 1, want PFIC 2 presenteert zich met neonatale hepatitis en een verstoring van de lobulaire architectuur (Bull et al., 1997). Daarnaast toonde de histologie reusceltransformatie, wat wordt gezien als het meest karakteristieke histologische teken van een BSEP afwijking, en pseudo-acinaire rosette formatie. Naast dat er naar de histologie gekeken kan worden, kan immunohistochemie (IHC) ook worden gebruikt voor de diagnose (Morotti et al., 2011). Bij PFIC 2 kan de *ABCB11* genmutatie leiden tot een afwijkende presentatie van het BSEP eiwit, waardoor er mogelijk ook een afwijking in de kleuring van BSEP met IHC is te zien. Echter, de aanwezigheid van BSEP expressie hoeft een BSEP afwijking niet uit te sluiten.

Naast PFIC 1 en 2 is er ook een type 3 PFIC, die wordt gekarakteriseerd door een afwijking in MDR3 ('class III multidrug resistance p-glycoprotein'), dat wordt veroorzaakt door een mutatie in het *ABCB4* gen (Morotti et al., 2011). Patiënten met deze variant presenteren zich met geelzucht, hepatomegalie en een stoelgang met een lage concentratie gal. Het moment van presentatie van deze symptomen kan variëren in leeftijden van 1 maand tot 20 jaar. Een verschil met PFIC 1 en 2 is dat PFIC 3 zich presenteert met verhoogde concentraties GGT, die wel 10 keer zo hoog kunnen zijn als de normaalwaarde. Smitt et al. toonde in hun experiment met muizen aan dat leverbiopten van PFIC 3 muizen ductulaire proliferatie met lichte

inflammatie en portale fibrose lieten zien (Smitt et al., 1993). Dit beeld komt overeen met de humane PFIC 3 variant. PFIC 3 leidt tot cholestase, doordat de toxische galzouten niet worden geïnactiveerd door fosfolipiden (Jacquemin, 2012). Figuur 1 toont een samenvatting van de gevolgen van de bovengenoemde mutaties.

Afgezien van PFIC 1-3, zijn de afgelopen jaren ook veel artikelen gepubliceerd over andere genmutaties die mogelijk betrokken zijn bij het ontstaan van PFIC. Voorbeelden van zulke genen zijn: *MYO5B* (Gonzales et al., 2017), *AP1S1* (Martinelli et al., 2013), *SCYL1* (Lenz et al., 2018), *VPS33B* (Qiu et al., 2019) en *VIPAS39*

(Cullinane et al., 2010). Van bovenstaande genen is bekend dat ze via intracellulaire routes invloed hebben bij de ontwikkeling van intrahepatische cholestase en dus mogelijk ook bij de ontwikkeling van PFIC. De PFIC varianten die ontstaan door mutaties in deze genen worden idiopathische PFICs genoemd, omdat de oorzaak van deze aandoeningen nog niet duidelijk is. In deze review wordt er naar een antwoord gezocht op de vraag via welke intracellulaire routes de bovenstaande genen invloed hebben op de ontwikkeling van PFIC en of er ook bepaalde knooppunten in deze routes zijn waar deze genen een overlappend effect hebben.



**Figuur 1:** Canaliculaire transporters die betrokken zijn bij PFIC 1-3. A. normale functies FIC 1, BSEP en MDR3. B. Pathologie van PFIC 1 (FIC 1 defect), PFIC 2 (BSEP defect) en PFIC 3 (MDR3 defect). FS= fosfatidylserine; FE= fosfatidylethanolamine; en FC=fosfatidylcholine (Aangepast van Jacquemin, 2012).

## Resultaten

### MYO5B

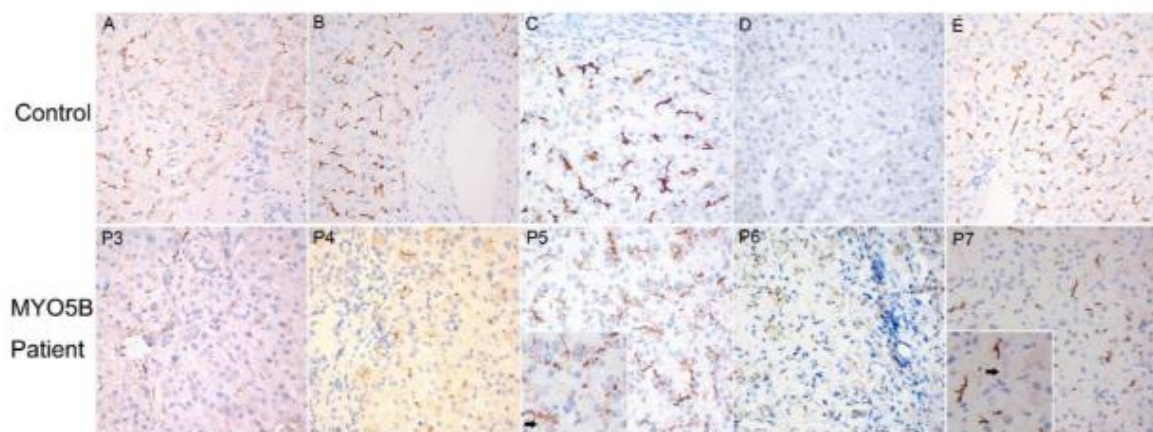
#### MYO5B gen & eiwit

Een van de nieuw ontdekte genen die gerelateerd is aan PFIC is het *MYO5B* gen (Gonzales et al., 2017). Dit gen codeert voor het op actine-filament gebaseerde motoreiwit myoVb dat betrokken is bij het membraantransport in epitheelcellen (Overeem et al., 2019; Girard et al., 2014). Het eiwit is nodig voor het transport van ABC transporters, zoals het BSEP eiwit, dat plaatsvindt via endosomen.

#### MVID & PFIC

Een mutatie in het *MYO5B* gen kan onder andere 'Microvillus inclusion disease' (MVID) veroorzaken (Girard et al., 2014; Dhekne et al., 2018; van der Velde et al., 2013). Dit is een darmziekte met ernstige diarree, waarbij sommige patiënten zich ook met cholestase presenteren. Deze cholestase zou het resultaat zijn van: 1. Een afwijking in de door *MYO5B/RAB11A* gemedieerde apicale recycling endosoom route in hepatocyten, en 2. een afwijkende plaatsing van het BSEP eiwit in het canaliculaire membraan. Echter zijn er ook

patiënten met een *MYO5B* mutatie en geïsoleerde cholestase zonder MVID (Gonzales et al., 2017). Dit impliceert dat *MYO5B* een PFIC gen is. In het experiment van Gonzales et al. werden *MYO5B* mutaties in patiënten gevonden met een normaal GGT- PFIC fenotype, zonder andere genmutaties. Sommige van de patiënten met *MYO5B* mutaties toonde afwijkingen in IHC kleuringen van de BSEP- en MDR3 eiwitten. De cholestase bij de patiënten lijkt op de variant die zich presenteert bij PFIC 1 of 2. Qiu et al. lieten in hun experiment ook zien dat de kleuringen van BSEP in de canaliculaire membranen meestal minder aanwezig waren in de patiënten met *MYO5B* mutaties (Fig. 2) (Qiu et al., 2017). Ze toonde ook aan dat de plasma galzout concentraties significant hoger waren in de patiënten met gemuteerde *MYO5B* genen, dan in de controlegroepen. Een conclusie die Qiu et al. trokken, was dat geïsoleerde cholestase, wat lijkt op PFIC, waarschijnlijk meer is gelinkt aan minder ernstige mutaties, terwijl ernstigere mutaties in *MYO5B* vaker MVID veroorzaken. En tot slot, suggereren de overeenkomende (verhoogde) plasma galzout-niveaus in *MYO5B* patiënten en *ABCB11* patiënten de BSEP-afwijkende betrokkenheid bij cholestase in *MYO5B* patiënten (Qiu et al., 2017).



**Figuur 2:** BSEP kleuring in patiënten met een *MYO5B* mutatie. A) Choledochale cyste controle zonder cholestase; B) Incidenteel weggehaalde normale lever controle; C) Gal atresie controle met cholestase; D) PFIC 2 patiënt met biallelische *ABCB11* mutaties; E) Afgedankte normale lever controle. Er blijkt minder expressie van BSEP te zijn in *MYO5B* patiënten P3, P4, P6 en P7. Daarnaast, toont P5 een afwijkende expressie van BSEP in het canaliculaire membraan en het cytoplasma. De zwarte pijlen bij P5 en P7 tonen afwijkingen (Qiu et al., 2017).

### **Intracellulaire route**

Zoals eerder is beschreven, zijn de eiwitten myoVb en rab11a belangrijk voor het transport van ABC transporters via recycling endosomen (Girard et al., 2014). Mutaties in de genen die coderen voor deze eiwitten kunnen ervoor zorgen dat BSEP niet correct in het canaliculaire membraan wordt geplaatst, waardoor de galzouten niet goed gesecerneerd kunnen worden. Hierdoor kunnen de galzouten binnen de hepatocyten ophopen, wat tot cholestase kan leiden. Overeem et al. bevestigden deze defecten in intracellulaire transportroutes die *MYO5B*-geassocieerde PFIC 6 veroorzaken (Overeem et al., 2019). Mutaties in het myoVb eiwit kunnen meerdere gevolgen hebben. De P660L mutatie in het myoVb eiwit, die met cholestase wordt geassocieerd, zorgt voor de intracellulaire accumulatie van galcanaliculaire eiwitten in vesiculair onderdelen. Echter, knock-outs van *MYO5B* resulteerde niet in defecten van canaliculaire lokalisatie. Daarentegen, myoVb mutanten die alleen beschikking hadden over het staart deel lieten een overeenkomend effect zien met de Myo5b-P660L mutatie. Ook toonde Overeem et al. aan dat mutanten met een defect motor deel van myoVb de formatie van apicale recycling endosomen remde en dat daarnaast de interactie met het rab11a eiwit nodig was voor het afwijkende effect in canaliculaire lokalisatie van eiwitten. Dit effect bleek zich te presenteren op het niveau van het trans-Golgi netwerk en het recycling endosoom.

### *AP1S1*

#### ***AP1S1* gen & eiwit**

Een ander gen dat betrokken blijkt te zijn bij de vorming van intrahepatische cholestase, is het *AP1S1* gen (Martinelli et al., 2013). Dit gen codeert voor  $\sigma 1A$ , een kleine subeenheid van het 'adaptor protein 1 complex'. Dit eiwit is van cruciaal belang voor de opbouw van een clathrine coating en het mediaert het transport tussen het Golgi systeem, endosomen en het plasmamembraan.

#### **MEDNIK syndroom & PFIC**

Mutaties in het *AP1S1* gen kunnen leiden tot het MEDNIK ('mental retardation, enteropathy,

deafness, neuropathy, ichtyosis, keratoderma') syndroom (Martinelli et al., 2013). Zoals de naam al zegt, presenteren patiënten met dit syndroom zich vaak met de bovenstaande verschijnselen. Echter bleek er in het experiment van Martinelli et al. een Joodse patiënt met een homozygote *AP1S1* mutatie te zijn, met vermoedelijk het MEDNIK syndroom, die zich presenteerde met intrahepatische cholestase en koperaccumulatie. Om de link tussen de *AP1S1* genmutatie en de afwijkingen in koper bij deze patiënt aan te tonen, werden de resultaten van eerder onderzochte Frans-Canadese MEDNIK patiënten onderzocht (Saba et al., 2005; Montpetit et al., 2008). In deze patiënten bleek er sprake te zijn van een leverziekte, dat zich presenteerde met hepatomegalie, verhoogde transaminases met tekenen van intrahepatische cholestase en een normaal GGT. Daarnaast vertoonden de onderzochte MEDNIK patiënten ook afwijkingen in de koperhomeostase, die overeenkomen met de Joodse patiënt van Martinelli et al. Het intracellulaire kopermetabolisme van 1 van de MEDNIK patiënten werd onderzocht in fibroblasten (Martinelli et al., 2013). Ze toonde aan dat *AP1S1* de intracellulaire kopermachinerie reguleert via koperpompeiwitten. Aangezien patiënten met een *AP1S1* mutatie zich kunnen presenteren met intrahepatische cholestase en een normaal GGT, kan het zijn dat een mutatie in het *AP1S1* gen een rol kan spelen bij de vorming van PFIC.

### **Intracellulaire route**

*AP1S1* mutaties verstoren het kopermetabolisme mogelijk door een verslechterde functies en transport van koper-ATPases, zoals ATP7A (Martinelli et al., 2013). Hierdoor raakt het intracellulaire kopermetabolisme verstoord. Het zou kunnen dat andere getransporteerde membraaneiwitten ook worden beïnvloedt door mutaties in het *AP1S1* gen. Een voorbeeld van zo'n membraaneiwit dat mogelijk wordt beïnvloedt door een *AP1S1* mutatie is BSEP. In 2014, beschreven Martinelli en Dionisi-Vici dat adapter eiwitcomplexen de selectie van eiwitten voor transport naar het Golgi systeem, lysosomen en het plasmamembraan bepalen (Martinelli & Dionisi-Vici, 2014). Het selecteren van deze eiwitten wordt gedaan op basis van herkenning van op tyrosine-gebaseerde signalen door AP-1 (Ohno et al., 1995; Ohno et al.,

1996; Höning et al., 1996). Uit een onderzoek uit 2012 blijkt dat BSEP beschikt over zo'n op tyrosine-gebaseerd motief en dat dit motief bepalend is voor de clathrine-afhankelijke internalisatie (Lam et al., 2012). Deze onderzoeken tonen aan dat het zou kunnen dat een *AP1S1* mutatie ervoor kan zorgen dat BSEP niet correct wordt geselecteerd voor transport naar het canaliculaire membraan. Dit kan ook van toepassing zijn op andere canaliculaire membraaneiwitten. Mogelijk wordt er in de toekomst meer duidelijk over een potentiële link tussen een *AP1S1* mutatie-geïnduceerd effect op het transport van membraaneiwitten en PFIC 1-3.

## SCYL1

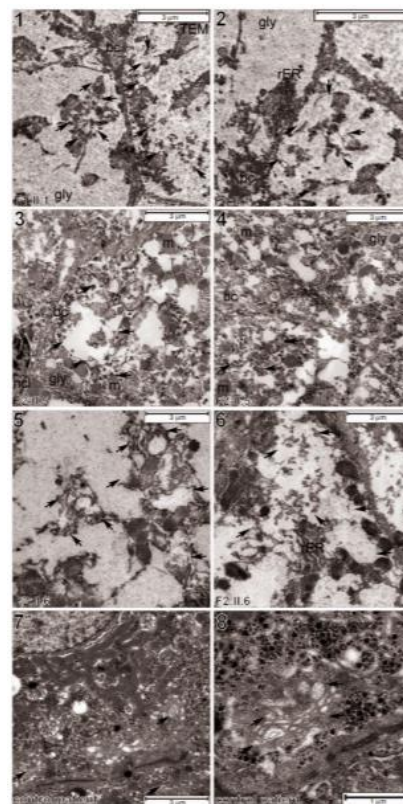
### SCYL1 gen & eiwit

Het *SCYL1* gen codeert voor het gelijknamige Scyl1 eiwit, dat onderdeel is van de SCY1 familie van katalytische inactieve eiwitkinases (Liu et al., 2000). Daarnaast blijkt het Scyl1 eiwit belangrijk te zijn bij de schakel tussen het Golgi apparaat en de membraantransport machinerie dat gemedieerd wordt door COPI- gecoate vesikels (Harmlin et al., 2014; Burman et al., 2008; Burman et al., 2010).

### CALFAN syndroom & PFIC

Biallelische mutaties in het *SCYL1* gen blijken betrokken te zijn bij de vorming van het CALFAN syndroom (Lenz et al., 2018). In het onderzoek van Lenz et al. werden 7 patiënten met biallelische *SCYL1* mutaties gevonden, die zich presenteren met een terugkerende laag-GGT cholestase of acute leverfalen in de kindertijd. Later in het leven van de patiënten bleken ook variërende neurologische verschijnselen zich te presenteren. De onderzoekers gaven het syndroom met de bovengenoemde verschijnselen de naam CALFAN syndroom ('low GGT cholestasis, acute liver failure, and neurodegeneration') (Lenz et al., 2018). Een van de patiënten met een *SCYL1* mutatie presenteerde zich met cholestase, hyperbilirubinemie, een verhoogd ASAT, een milde verslechterde leverfunctie en een lichte verhoging van GGT. De andere patiënten met een biallelische *SCYL1* mutatie toonden ook ernstige cholestatische leveraandoeningen met een licht ver-

hoogde GGT. De leverbiopten die bij de patiënten werden genomen, toonden microvesiculaire steatose en fibrose als meest opmerkelijke verschijnselen. TEM ('transmission electron microscopy') toonde extreem gedisorgeïneerde, moeilijk herkenbare Golgi structuren in de buurt van de galcanaliculi (Fig. 3). Dit impliceert de link tussen *SCYL1* mutaties en de Golgi morfologie. Dit komt overeen met een eerdere studie, die aantoonde dat Scyl1 de Golgi morfologie reguleert (Burman et al., 2010). Daarnaast bleek in *SCYL1*-defecte fibroblasten een verzwakte en vertraagde transport vanuit het Golgi plaats te vinden. Uit de gegevens van de onderzochte patiënten, bleek dat levertransplantatie kan helpen als therapie voor de lever-symptomen (Lenz et al., 2018). Het intrahepatische fenotype waarmee CALFAN patiënten zich presenteren, laag-GGT cholestase, komt overeen met het fenotype van sommige PFIC patiënten.



**Figuur 3:** Transmissie elektron microscopie (TEM) toont vergrote Golgi cisternae in patiënten met een *SCYL1* mutatie (1-6). 7 en 8 tonen een normale morfologie van het Golgi apparaat in controle patiënten. bc= gal canaliculus; gly=glycogeen; rER=ruw endoplasmatisch reticulum (Lenz et al., 2018).

Echter presenteren de CALFAN patiënten zich met een terugkerende cholestase, die soms ook weer verdwijnt, terwijl PFIC patiënten zich presenteren met een cholestase die steeds erger wordt. Om aan te tonen dat het *SCYL1* gen een mogelijk PFIC gen is, moeten er in de toekomst ook patiënten zijn die zich presenteren met geïsoleerde blijvende intrahepatische cholestase, zonder andere CALFAN symptomen.

### Intracellulaire route

Het onderliggende mechanisme van CALFAN en *SCYL1* mutaties is nog niet bekend (Lenz et al., 2018). Wel is zeker dat *Scyl1* belangrijk is voor het transport van bepaalde membraaneiwitten vanuit het Golgi apparaat via COPI-gecoate vesikels (Harmlin et al., 2014; Burman et al., 2008; Burman et al., 2010). Het kan zijn dat de cholestase bij CALFAN patiënten wordt veroorzaakt door fouten in het transport van membraaneiwitten die belangrijk zijn voor de galzouthomeostase. Mutaties in *Scyl1* zouden ervoor kunnen zorgen dat het vervoer van de COPI-gecoate vesikels verstoord raakt. Daarnaast is het bekend dat de cholestase bij CALFAN patiënten wordt geïnitieerd door koorts en infecties (Lenz et al., 2018). Bij koorts is er sprake van een verhoging van de lichaamstemperatuur en dit kan misschien wel zorgen voor misvouwing van *Scyl1*. Beide gebeurtenissen kunnen mogelijk resulteren in fouten in het transport van bijvoorbeeld BSEP via vesikels. Dit kan resulteren in dat BSEP niet goed terecht komt in het canaliculaire membraan van de hepatocyten. Dit kan een verklaring zijn voor de cholestase die ontstaat. Echter zijn dit alleen speculaties en zijn er studies in de toekomst nodig die kijken of er bij *SCYL1* mutaties afwijkingen in canaliculaire membraaneiwitten zijn, zoals BSEP. Een voorbeeld van zo'n studie is dat met behulp van IHC de expressie- en plaatsing van canaliculaire membraaneiwitten in *SCYL1* knock-out muizen worden onderzocht.

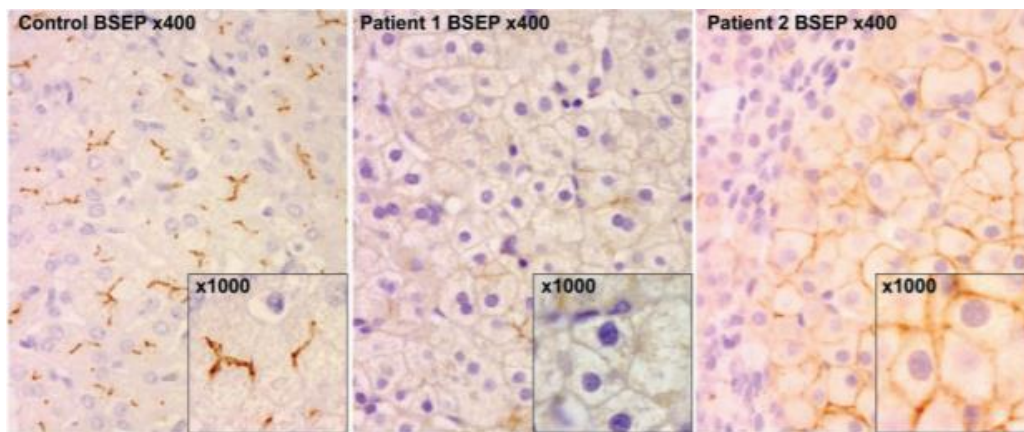
## VPS33B & VIPAS39

### De VPS33B en VIPAS39 genen & eiwitten

*VPS33B* en *VIPAS39* worden in hetzelfde stuk benoemd, omdat ze een interactie met elkaar aangaan en mutaties die in een van beide genen ontstaan dezelfde gevolgen kunnen hebben (Cullinane et al., 2010). Ten eerste het *VPS33B* gen. Dit gen is gelokaliseerd op chromosoom 15q26.1 en codeert voor het *vps33b* eiwit (Huizing et al., 2001). Dit eiwit bevat een Sec-1 domein dat belangrijk is voor de regulatie van de transformatie van een vesikel naar een SNARE complex en voor de membraanfusie (Halachmi & Lev, 1996; Jahn & Sudhof, 1999; Rothman, 1994). Ten tweede het *VIPAS39* gen, wat codeert voor het VIPAR ('VPS33B interacting protein, apical-basolateral polarity regulator') eiwit (Cullinane et al., 2010; Smith et al., 2012). VIPAR vormt een functioneel complex met *vps33b* en gaat een interactie aan met *rab11a*. Het *vps33b*-VIPAR complex heeft meerdere functies in de routes die de apicale-basolaterale polariteit in de lever- en nieren reguleren.

### ARC syndroom en PFIC

Kiemcelmutaties in het *VPS33B* gen kunnen het ARC syndroom veroorzaken (Gissen et al., 2004). Het ARC syndroom is een autosomaal recessieve multisystemische aandoening, gekarakteriseerd door neurogene artrogyrose, tubulaire nierdysfunctie en neonatale cholestase met galweg hypoplasie en een laag GGT. Kleuringen van bepaalde antigenen (CEA en CD26) toonden een afwijkend patroon in leverbiopten van ARC patiënten dat overeen kwam met afwijkingen in membraanpolarisatie en transport van oppervlakte eiwitten (Gissen et al., 2004). Naast *VPS33B* mutaties, kunnen ook mutaties in *VIPAR* het ARC syndroom veroorzaken (Cullinane et al., 2010). In het onderzoek van Cullinane et al. bleek er geen verschil in klinische presentatie te zijn bij *VPS33B*- of *VIPAR* gemuteerde ARC patiënten. Er bleken meerdere resultaten te zijn die mogelijk de cholestase die zich bij ARC patiënten presenteert, verklaren. Ten eerste toonde kleuringen in de ARC patiënten misplaatsing van BSEP (Fig. 4). Daarnaast resulteerde knockdown van *VPS33B*- en *VIPAR* in abnormale galwegontwikkeling in zebrafissen. Ook bleek er in *vipar* knockdown



**Figuur 4:** Anti-BSEP kleuringen tonen afwijkingen in BSEP lokalisatie in het canaliculaire membraan bij ARC patiënten. Patiënt 1= *VPS33B* mutaties, Patiënt 2= *VIPAR* mutaties (Cullinane et al., 2010).

zebravissen sprake te zijn van een verlaging van E-cadherine en claudin-I. Dit zijn belangrijke 'Tight Junction' eiwitten. Deze bevindingen komen overeen met andere studies (Matthews et al., 2005; Hanley et al., 2017; Fu et al., 2019). Deze resultaten tonen aan dat er in patiënten met het ARC syndroom defecten ontstaan in belangrijke onderdelen van de hepatocyten en galwegen. Deze defecten kunnen ervoor zorgen dat het gal niet goed wordt uitgescheiden, bijvoorbeeld via BSEP, en dat het zich kan gaan ophopen in de hepatocyten. Dit kan leiden tot cholestase. In 2019 bleken er ook patiënten met een *VPS33B* mutatie te zijn, die zich presenteerde met een geïsoleerde laag-GGT cholestase (Qiu et al., 2019). Hierbij kwamen de cholestatische kenmerken van de patiënten overeen met de kenmerken die zich presenteren bij BSEP defecten. Dit suggereert dat *VPS33B*, en mogelijk ook *VIPAR* vanwege diens interactie met *VPS33B*, genen zijn die mogelijk betrokken kunnen zijn bij de ontwikkeling van PFIC, bijvoorbeeld PFIC 2.

#### Intracellulaire route

Gissen et al. concludeerde in 2004, dat mutaties in *VPS33B* de symptomen van het ARC syndroom verklaarden en dat deze mutaties werden geassocieerd met afwijkingen in intracellulair eiwittransport en membraanfusie mechanismen (Gissen et al., 2004). Ook is het bekend dat het *vps33b*-*VIPAR* complex mogelijk van belang is bij de stabilisatie van apicale membraaneiwitten, zoals BSEP, via *RAB11A*-afhankelijke apicale recycling routes (Cullinane et al., 2010). Consequenties van afwijkingen in de apicale eiwit routes, zijn onder andere het fout

sorteren van de apicale eiwitten in het basolaterale membraan en in late endosomen- en lysosomen. Dit kan resulteren in cholestase. Daarnaast kan het zijn dat bij *VPS33B*/*VIPAR* afwijkingen, de apicale membraaneiwitten in de foute recycling endosomen terecht komen, wat uiteindelijk kan leiden tot afbraak van deze eiwitten. Tornieri et al. toonde aan dat *VPS33B* mutaties zorgen voor een defecte overlap van *VIPAS39* (*VIPAR*)- en *vps33b*-positieve compartimenten (Tornieri et al., 2013). Dit kan mogelijk verklaren hoe de apicale membraaneiwitten in de foute recycling endosomen terechtkomen.

#### Knooppunten genen in intracellulaire routes

In de bovenstaande resultaten zijn meerdere genen behandeld die betrokken zijn bij intrahepatische cholestase (Tabel 1). Van deze genen is bekend dat mutaties in die genen bepaalde syndromen veroorzaken die zich presenteren met meerdere symptomen, waaronder intrahepatische cholestase. De genen coderen voor eiwitten die een rol spelen in bepaalde intracellulaire routes. Opvallend is dat deze eiwitten via de intracellulaire routes ook invloed hebben op eiwitten die een rol spelen bij PFIC, zoals BSEP. Daarnaast bleek uit de literatuur dat er ook overlap is tussen deze intracellulaire routes (Fig. 5).

#### *MYO5B* & *VPS33B*/*VIPAR*

*MYO5B* codeert voor het myoVb eiwit, dat belangrijk is voor het door *RAB11A*-gemedieerde



transport van ABC transporters via recycling endosomen (Girard et al., 2014). In 2019 beschreven Overeem et al. dat defecten in *myoVb* en diens intracellulaire route mogelijk PFIC veroorzaken en ze noemde deze *myoVb*-geassocieerde PFIC, PFIC 6 (Overeem et al., 2019). Daarvoor beschreven Cullinane et al. in 2010, dat het *vps33b*-VIPAR complex mogelijk een rol speelt bij de stabilisatie van apicale membraan-eiwitten, via *RAB11A*-afhankelijke apicale recycling routes (Cullinane et al., 2010). Deze bevindingen suggereren dat er een overlap is tussen de intracellulaire routes van het *myoVb* eiwit en die van het *vps33b*-VIPAR complex. Beide routes spelen een rol bij het transport van apicale membraan-eiwitten. Daarnaast blijkt dat bij mutaties in zowel *MYO5B*, als in *VPS33B/VIPAR*, sprake is van misplaatsing van het apicale membraan-eiwit BSEP (Qiu et al., 2017; Cullinane et al., 2010). Deze misplaatsing van BSEP kan een van de redenen zijn dat er intrahepatische cholestase ontstaat. Het is bekend dat PFIC 2 wordt veroorzaakt door een defect in BSEP (Morotti et al., 2011). Echter het kan dus ook zijn dat het BSEP eiwit functioneel in orde is, maar dat het niet correct in het canaliculaire membraan wordt geplaatst, zoals bij *MYO5B*-en *VPS33B/VIPAR* mutaties. Deze bovengenoemde bevindingen suggereren dat *MYO5B*, *VPS33B* en *VIPAR* PFIC genen zijn en dat mutaties in deze genen via dezelfde intracellulaire routes bepaalde PFICs kunnen veroorzaken, zoals PFIC 2.

### **AP1S1 & SCYL1**

*AP1S1* codeert voor  $\sigma 1A$ , dat onderdeel is van het adapter eiwit 1 complex (Martinelli et al., 2013). Mutaties in *AP1S1* blijken te zorgen voor afwijkingen in het transport van bepaalde ATPases. Daarnaast blijken adapter eiwitcomplexen de selectie van eiwitten voor transport naar het Golgi systeem, lysosomen en het plasmamembraan te reguleren (Martinelli & Dionisi-Vici, 2014). Mutaties in *AP1S1* verstoren bovenstaande intracellulaire routes en veroorzaken intrahepatische cholestase. Het *SCYL1* gen codeert voor het *Scyl1* eiwit (Liu et al., 2000). Ook dit eiwit blijkt belangrijk te zijn bij het transport van membraan-eiwitten van het Golgi apparaat naar het membraan, via COPI-gecoate vesikels (Harmlin et al., 2014; Burman et al., 2008; Burman et al., 2010). Mutaties in *SCYL1* leidt, net zoals mutaties in *AP1S1*, onder andere tot intrahepatische cholestase (Martinelli et al., 2013; Lenz et al., 2018). Er lijkt dus sprake te kunnen zijn van een overlap in de intracellulaire routes van  $\sigma 1A$  en het *Scyl1* eiwit, namelijk bij het transport van membraan-eiwitten tussen het Golgi apparaat en het apicale membraan. Afwijkingen in deze routes kunnen zorgen voor misplaatsing van bijvoorbeeld BSEP, met cholestase als gevolg. Mutaties in *AP1S1* en *SCYL1* kunnen mogelijk dus zorgen voor cholestatische varianten met een PFIC 2 fenotype. En misschien zijn er ook wel relaties met andere PFIC varianten.

**Tabel 1: Samenvatting onderzochte genen**

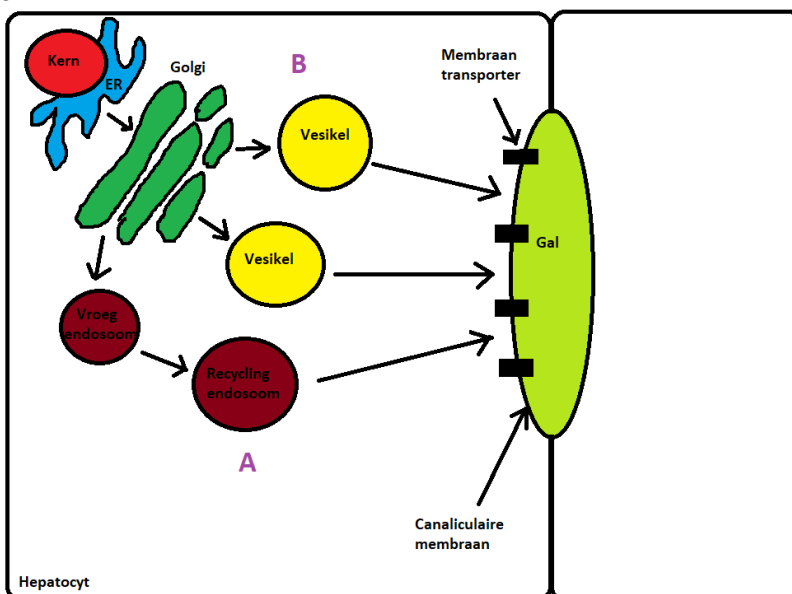
Genen	Eiwit	Syndromen	Intracellulaire transport route
<i>MYO5B</i>	<i>myoVb</i>	MVID	Transport van ABC transporters via endosomen
<i>AP1S1</i>	$\sigma 1A$	MEDNIK	Transport tussen het Golgi systeem, endosomen en het plasmamembraan
<i>SCYL1</i>	<i>Scyl1</i>	CALFAN	Transport tussen het Golgi systeem en het membraan
<i>VPS33B</i>	<i>vps33b</i>	ARC	Transport van apicale membraan-eiwitten via recycling endosomen
<i>VIPAS39</i>	VIPAR	ARC	Transport van apicale membraan-eiwitten via recycling endosomen

## Conclusie & Discussie

Het doel van deze review was om de genen *MYO5B*, *AP1S1*, *SCYL1*, *VPS33B* & *VIPAS39* te bestuderen en om te kijken wat hun relatie is met PFIC. Hierbij werden de intracellulaire routes behandeld, waarbij de eiwitten, die ontstaan uit deze genen, een rol spelen. Ten eerste, het *MYO5B* gen, dat codeert voor het myoVb eiwit. Afwijkingen in dit eiwit kunnen MVID veroorzaken, maar daarnaast bleken er ook patiënten met *MYO5B* mutaties te zijn die zich presenteren met geïsoleerde cholestase. MyoVb is samen met rab11a van belang voor het transport van ABC transporters. Afwijkingen in myoVb kunnen dus zorgen voor een fout in het transport van ABC transporters. Een voorbeeld van zo'n ABC transporter is BSEP, waarvan afwijkingen gerelateerd zijn aan PFIC 2. Afwijkingen in myoVb kunnen dus het transport van BSEP naar het canaliculaire membraan beïnvloeden. Doordat BSEP niet correct in het canaliculaire membraan wordt geplaatst, kan er intrahepatische cholestase ontstaan. Het fenotype van deze door *MYO5B* mutatie geïnduceerde cholestase lijkt op dat van PFIC 1 en 2. Al met al lijken de betrokkenheid van myoVb bij het transport van BSEP en het overeenkomende cholestatische fenotype met PFIC 1 en 2 te suggereren dat myoVb een PFIC gen is.

Ten tweede, het *AP1S1* gen, dat codeert voor  $\sigma 1A$ , een kleine subeenheid van het 'adaptor protein 1 complex'. Mutaties in het *AP1S1* gen worden geassocieerd met het MEDNIK syndroom. Er blijken ook MEDNIK patiënten te zijn die zich presenteren met intrahepatische cholestase en een normaal GGT. Adapter eiwitcomplexen, waar  $\sigma 1A$  ook deel van uitmaakt, blijken belangrijk te zijn bij de selectie van eiwitten voor transport naar het Golgi systeem, lysosomen en het plasmamembraan. Het kan zijn dat mutaties in *AP1S1* kunnen zorgen voor foute selectie van FIC1, BSEP en MDR3, en ze daardoor intrahepatische PFIC-gerelateerde cholestase veroorzaken. Deze mogelijke relatie moet in de toekomst worden onderzocht, bijvoorbeeld met *AP1S1* knock-out experimenten en IHC kleuringen voor de bekende PFIC eiwitten.

Ten derde, het *SCYL1* gen, dat codeert voor het gelijknamige Scyl1 eiwit. Defecten in dit eiwit veroorzaken het CALFAN syndroom, waarbij een van de kernverschijnselen laag-GGT cholestase is. Het onderliggende mechanisme van hoe Scyl1 defecten het CALFAN syndroom veroorzaakt, is niet bekend en dit is een van de dingen die men in de toekomst moet ontdekken. Desalniettemin, kan er wel worden bedacht hoe dit mechanisme mogelijk in elkaar zit.



**Figuur 5:** Overlapping in intracellulaire routes. A) *MYO5B*, *VPS33B* en *VIPAR* zijn allemaal betrokken bij het transport van membraaneiwitten via recycling endosomen. B) *AP1S1* en *SCYL1* zijn beide betrokken bij het transport van membraaneiwitten tussen het Golgi apparaat en het membraan.

Het is bekend dat het Scyl1 eiwit van belang is voor het transport van membraaneiwwitten vanuit het Golgi apparaat naar het membraan. Dit komt overeen met  $\sigma 1A$ . Defecten in deze transportroute kunnen mogelijk resulteren in misplaatsing van belangrijke eiwwitten in het apicale membraan, waardoor de galhomeostase verstoord raakt. Ook hierbij kan men speculeren over hoe eiwwitten die een rol spelen bij het ontstaan van PFIC 1-3 mogelijk worden beïnvloed door Scyl1 defecte-transport routes. Echter zijn er experimenten in de toekomst nodig die daadwerkelijk de relatie tussen mutaties in *SCYL1* en PFIC aantonen.

Tot slot, *VPS33B* & *VIPAS39*. Deze genen coderen voor de vps33b en VIPAR eiwwitten, die samen een complex vormen. Afwijkingen in deze eiwwitten veroorzaken het ARC syndroom, waarbij een van de kenmerken neonatale cholestase met een laag GGT is. Normaliter zorgt de connectie tussen vps33b en VIPAR voor fusie van membranen van bepaalde organellen, zoals endosomen. Het kan zijn dat afwijkingen in vps33b of VIPAR zorgen voor fusie van foute organellen, die het transport van membraaneiwwitten kunnen verstoren. Net zoals myoVb, heeft het vps33b-VIPAR complex invloed op transport routes via een *RAB11A*-gemedieerde interactie met apicale recycling endosomen. Defecten in vps33b of VIPAR kunnen dus net zoals myoVb resulteren in misplaatsing van belangrijke apicale membraaneiwwitten, zoals BSEP. Dit is ook al aangetoond in ARC patiënten met behulp van kleuringen van BSEP. Afwijkingen in de plaatsing van BSEP in het apicale membraan van de hepatocyten in ARC patiënten, suggereert de associatie tussen mutaties in *VPS33B* & *VIPAS39* en PFIC 2.

Echter zijn er wel enkele kanttekeningen aan de resultaten van deze review. Ten eerste, zijn PFIC en de andere syndromen die zijn benoemd relatief zeldzaam. Hierdoor komen in de meeste onderzoeken die in deze review zijn gebruikt maar kleine patiëntgroepen voor. Dit maakt het lastiger om conclusies te kunnen trekken over de relatie tussen de onderzochte genen en PFIC. Dit leidt dan ook naar het tweede knelpunt, namelijk dat er bij sommige van de onderzochte genen uit deze review nog geen significante bewijzen zijn gevonden over of er een duidelijke relatie is met PFIC. Dit ver-

schilt per gen, want *MYO5B* wordt in de literatuur soms al de veroorzaker van PFIC 6 genoemd, terwijl bij *SCYL1* er veel minder bekend is over de relatie met PFIC. Hopelijk worden er in de toekomst experimenten opgesteld, die daadwerkelijk deze relatie kunnen aanduiden. Hierbij zal het helpen als er in de toekomst meer patiënten aan het licht komen die zich met een PFIC fenotype presenteren en waarbij via gen screeningsmechanismen de mutaties worden herkend waarvan nu nog onzeker is of ze een causaal verband met PFIC hebben.

De kennis die met deze toekomstige experimenten verworven wordt, kan mogelijk ook worden gebruikt voor therapie van PFIC. Patiënten worden tegenwoordig behandeld met UDCA ('ursadeoxycholic acid') en uiteindelijk soms zelfs levertransplantatie (Jacquemin, 2012). Echter reageren niet alle patiënten op deze behandeling (Jacquemin, 2012). *AP1S1*-geassocieerde cholestase kan ook behandeld worden met zink acetaat (Martinelli et al., 2013). Maar indien de relatie tussen de genen eiwwitten uit deze review en PFIC bewezen wordt, kunnen er ook specifieke middelen worden geproduceerd om de veroorzakers van de intracellulaire afwijkingen te beïnvloeden. Zo concludeerde Overeem et al. dat myoVb mutanten de interactie met rab11a nodig hebben om cholestase te veroorzaken (Overeem et al., 2019). Deze interactie kan men mogelijk verstoren met bepaalde moleculen, waardoor mogelijk de cholestase verdwijnt. Daarnaast kan mogelijk in de toekomst de genmutaties weer worden hersteld met gentherapie. CRISPR-CAS is de afgelopen jaren erg veel onderzocht en eventueel kan men in de toekomst deze techniek gebruiken voor de behandeling van PFIC en andere ziektes. Een andere strategie in de behandeling van PFIC is het preventief screenen van baby's. Indien het duidelijk is welke erfelijke mutaties in genen de veroorzakers zijn van PFIC, kan er specifiek op deze mutaties worden gescreend. Tegenwoordig is er veel bekend over de mutaties in de PFIC 1-3 genen en door het herkennen van de mutaties die in deze scriptie zijn benoemd, wordt het bereik om een pathogene mutatie te vinden een stuk groter. Hierdoor is de kans groter dat de causale mutatie sneller wordt gevonden en kan er eerder worden nagedacht over wat voor thera-

pie er moet worden gebruikt. Dit kan erge ziekteverschijnselen mogelijk voorkomen of uitstellen, wat de kwaliteit van leven van het kind kan verbeteren. Echter, moet hierbij wel rekening worden gehouden met de ethiek.

Samenvattend, heeft deze review de relatie tussen de genen *MYO5B*, *AP1S1*, *SCYL1*, *VPS33B* en *VIPAS39* en PFIC aan het licht gebracht. Deze genen worden geassocieerd met intrahepatische cholestase en afwijkingen in het transport van FIC 1, BSEP en MDR3. Dit suggereert de relatie met PFIC 1-3. Daarnaast blijken er overlappingen in de intracellulaire routes te zijn, waar mutaties in bovenstaande genen invloed op hebben. *MYO5B* en *VPS33B/VIPAS39* blijken te overlappen in het door *RAB11A*-gemedieerde endosomale transport van membraaneiwitten. *AP1S1* en *SCYL1* blijken te overlappen in het transport van eiwitten tussen het Golgi apparaat en het hepatocyt membraan. De toekomstige kennis over de relatie tussen deze genen en PFIC en diens aangepaste intracellulaire routes, maken het hopelijk mogelijk om de huidige therapie voor PFIC te verbeteren en om meer patiënten te kunnen helpen.

## Methodes

Voor deze scriptie zijn artikelen gebruikt die te vinden zijn op PUBMED. De scriptiebegeleider heeft mij enkele genen aangedragen, die ik in deze scriptie heb onderzocht. De artikelen zijn gevonden op basis van de volgende zoekopdrachten: 'Type gen AND intrahepatic cholestasis', 'type gen AND cholestasis', 'progressive familial intrahepatic cholestasis' en 'type gen AND bijhorende syndroom'.

## Literatuurlijst

1. Alvarez L, Jara P, Sánchez- Sabaté E, Hierro L, Larrauri J, Díaz MC, et al. Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1. *Hum Mol Genet* 2004;13:2451- 60
2. Bull LN, Carlton VE, Stricker NL, Baharloo S, De-Young JA, Freimer NB, Magid MS, Kahn E, Markowitz J, DiCarlo FJ, McLoughlin L, Boyle JT, Dahms BB, Faught PR, Fitzgerald JF, Piccoli DA, Witzleben CL, O'Connell NC, Setchell KD, Agostini RM Jr, Kocoshis SA, Reyes J, Knisely AS. Genetic and morphological findings in progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease [PFIC-1] and Byler syndrome): evidence for heterogeneity. *Hepatology*. 1997 Jul; 26(1):155-64. PubMed PMID: 9214465.
3. Burman JL, Bourbonniere L, Philie J, Stroth T, Dejgaard SY, Presley JF, McPherson PS. *Scyl1*, mutated in a recessive form of spinocerebellar neurodegeneration, regulates COPI-mediated retrograde traffic. *J Biol Chem*. 2008 Aug 15; 283(33):22774-86. doi: 10.1074/jbc.M801869200. Epub 2008 Jun 13. PubMed PMID: 18556652.
4. Burman JL, Hamlin JN, McPherson PS. *Scyl1* regulates Golgi morphology. *PLoS One*. 2010 Mar 4; 5(3):e9537. doi: 10.1371/journal.pone.0009537. PubMed PMID: 20209057; PubMed Central PMCID: PMC2832016.
5. Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, Neimark E, Bull LN, Knisely AS, Strautnieks SS, Thompson RJ, Magid MS, Gordon R, Balasubramanian N, Suchy FJ, Shneider BL. Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity. *Gastroenterology*. 2004 Mar; 126(3):756-64. PubMed PMID: 14988830.
6. Clayton RJ, Iber FL, Ruebner BH, McKusick VA. Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred. *Am J Dis Child*. 1969 Jan; 117(1):112-24. PubMed PMID: 5762004.
7. Cullinane AR, Straatman-Iwanowska A, Zaucker A, Wakabayashi Y, Bruce CK, Luo G, Rahman F, Gürakan F, Utine E, Ozkan TB, Denecke J, Vukovic J, Di Rocco M, Mandel H, Cangul H, Matthews RP, Thomas SG, Rappoport JZ, Arias IM, Wolburg H, Knisely AS, Kelly DA, Müller F, Maher ER, Gissen P. Mutations in *VIPAR* cause an arthrogyrosis, renal dysfunction and cholestasis syndrome phenotype with defects in epithelial polarization. *Nat Genet*. 2010 Apr; 42(4):303-12. doi: 10.1038/ng.538. Epub 2010 Feb 28. Erratum in: *Nat Genet*. 2011 Mar; 43(3):277. PubMed PMID: 20190753; PubMed Central PMCID: PMC5308204.
8. Dhekne HS, Pylypenko O, Overeem AW, Zibouche M, Ferreira RJ, van der Velde KJ, Rings EHHM, Posovszky C, van der Sluijs P, Swertz MA, Houdusse A, van IJendoorn SCD. *MYO5B*, *STX3*, and *STXBP2* mutations reveal a common disease mechanism that unifies a subset of congenital diarrheal disorders: A mutation update. *Hum Mutat*. 2018 Mar; 39(3):333-344. doi: 10.1002/humu.23386. Epub 2018 Jan 17. Review. Erratum in: *Hum Mutat*. 2018 Oct; 39(10):1468. PubMed PMID: 29266534; PubMed Central PMCID: PMC5838515.
9. Fu K, Wang C, Gao Y, Fan S, Zhang H, Sun J, Jiang Y, Liu C, Guan L, Liu J, Huang M, Bi H. Metabolomics and Lipidomics Reveal the Effect of Hepatic *Vps33b* Deficiency on Bile Acids and Lipids Metabolism. *Front Pharmacol*. 2019 Mar 22; 10:276. doi: 10.3389/fphar.2019.00276. eCollection 2019. PubMed PMID: 30967781; PubMed Central PMCID: MC6439481.

10. Girard M, Lacaille F, Verkarre V, Mategot R, Feldmann G, Grodet A, Sauvat F, Irtan S, Davit-Spraul A, Jacquemin E, Ruumelle F, Rainteau D, Goulet O, Colomb V, Chardot C, Henrion-Caude A, Debray D. MYO5B and bile salt export pump contribute to cholestatic liver disorder in microvillous inclusion disease. *Hepatology*. 2014 Jul; 60(1):301-10. doi: 10.1002/hep.26974. Epub 2014 May 27. PubMed PMID: 24375397.
11. Gissen P, Johnson CA, Morgan NV, Stapelbroek JM, Forsheew T, Cooper WN, McKiernan PJ, Klomp LW, Morris AA, Wraith JE, McClean P, Lynch SA, Thompson RJ, Lo B, Quarrell OW, Di Rocco M, Trembath RC, Mandel H, Wali S, Karet FE, Knisely AS, Houwen RH, Kelly DA, Maher ER. Mutations in VPS33B, encoding a regulator of SNARE-dependent membrane fusion, cause arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis (ARC) syndrome. *Nat Genet*. 2004 Apr; 36(4):400-4. Epub 2004 Mar 28. PubMed PMID: 15052268.
12. Gonzales E, Taylor SA, Davit-Spraul A, Thébaud A, Thomassin N, Guettier C, Whittington PF, Jacquemin E. MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease. *Hepatology*. 2017 Jan; 65(1):164-173. doi: 10.1002/hep.28779. Epub 2016 Oct 5. PubMed PMID: 27532546.
13. Halachmi N, Lev Z. The Sec1 family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. *J Neurochem*. 1996 Mar; 66(3):889-97. Review. PubMed PMID: 8769846.
14. Hamlin JN, Schroeder LK, Fotouhi M, Dokainish H, Ioannou MS, Girard M, Summerfeldt N, Melançon P, McPherson PS. Scyl1 scaffolds class II Arfs to specific subcomplexes of coatamer through the  $\gamma$ -COP appendage domain. *J Cell Sci*. 2014 Apr 1; 127(Pt 7):1454-63. doi: 10.1242/jcs.136481. Epub 2014 Jan 30. PubMed PMID: 24481816.
15. Hanley J, Dhar DK, Mazzacuva F, Fiadeiro R, Burden JJ, Lyne AM, Smith H, Straatman-Iwanowska A, Banushi B, Virasami A, Mills K, Lemaigre FP, Knisely AS, Howe S, Sebire N, Waddington SN, Paulusma CC, Clayton P, Gissen P. Vps33b is crucial for structural and functional hepatocyte polarity. *J Hepatol*. 2017 May; 66(5):1001-1011. doi: 10.1016/j.jhep.2017.01.001. Epub 2017 Jan 9. PubMed PMID: 28082148; PubMed Central PMCID: PMC5387182.
16. Höning S, Griffith J, Geuze HJ, Hunziker W. The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J*. 1996 Oct 1; 15(19):5230-9. PubMed PMID: 8895568; PubMed Central PMCID: PMC452267.
17. Huizing M, Didier A, Walenta J, Anikster Y, Gahl WA, Krämer H. Molecular cloning and characterization of human VPS18, VPS 11, VPS16, and VPS33. *Gene*. 2001 Feb 21; 264(2):241-7. PubMed PMID: 11250079.
18. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012 Sep; 36 Suppl 1:S26-35. doi: 10.1016/S2210-7401(12)70018-9. Review. PubMed PMID: 23141890.
19. Jahn R, Südhof TC. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem*. 1999; 68:863-911. Review. PubMed PMID: 10872468.
20. Lam P, Xu S, Soroka CJ, Boyer JL. A C-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis. *Hepatology*. 2012 Jun; 55(6):1901-11. doi: 10.1002/hep.25523. Epub 2012 Apr 25. PubMed PMID: 22161577; PubMed Central PMCID: PMC3319652.
21. Lenz D, McClean P, Kansu A, Bonnen PE, Rannucci G, Thiel C, Straub BK, Harting I, Alhaddad B, Dimitrov B, Kotzaeridou U, Wenning D, Iorio R, Himes RW, Kuloğlu Z, Blakely EL, Taylor RW, Meitinger T, Kölker S, Prokisch H, Hoffmann GF, Haack TB, Stauffer C. SCYL1 variants cause a syndrome with low  $\gamma$ -glutamyl-transferase cholestasis, acute liver failure, and neurodegeneration (CALFAN). *Genet Med*. 2018 Oct; 20(10):1255-1265. doi: 10.1038/gim.2017.260. Epub 2018 Feb 8. PubMed PMID: 29419818; PubMed Central PMCID: PMC5989927.
22. Liu SC, Lane WS, Lienhard GE. Cloning and preliminary characterization of a 105 kDa protein with an N-terminal kinase-like domain. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Dec 15; 1517(1):148-52. PubMed PMID: 11118629.
23. Martinelli D, Travaglini L, Drouin CA, Ceballos-Picot I, Rizza T, Bertini E, Carrozzo R, Petrini S, de Lonlay P, El Hachem M, Hubert L, Montpetit A, Torre G, Dionisi-Vici C. MEDNIK syndrome: a novel defect of copper metabolism treatable by zinc acetate therapy. *Brain*. 2013 Mar; 136(Pt 3):872-81. doi: 10.1093/brain/awt012. Epub 2013 Feb 18. Erratum in: *Brain*. 2013 Oct; 136(Pt 10): e256. PubMed PMID: 23423674.
24. Martinelli D, Dionisi-Vici C. AP1S1 defect causing MEDNIK syndrome: a new adaptinopathy associated with defective copper metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 May; 1314:55-63. doi: 10.1111/nyas.12426. Epub 2014 Apr 22. PubMed PMID: 24754424.
25. Matthews RP, Plumb-Rudewicz N, Lorent K, Gissen P, Johnson CA, Lemaigre F, Pack M. Zebrafish vps33b, an ortholog of the gene responsible for human arthrogryposis-renal dysfunction-cholestasis syndrome, regulates biliary development downstream of the onecut transcription factor hnf6. *Development*. 2005 Dec; 132(23):5295-306. PubMed PMID: 16284120.
26. Montpetit A, Côté S, Brustein E, Drouin CA, Lapointe L, Boudreau M, Meloche C, Drouin R, Hudson TJ, Drapeau P, Cossette P. Disruption

- of AP1S1, causing a novel neurocutaneous syndrome, perturbs development of the skin and spinal cord. *PLoS Genet.* 2008 Dec; 4(12):e1000296. doi: 10.1371/journal.pgen.1000296. Epub 2008 Dec 5. PubMed PMID: 19057675; PubMed Central PMCID: PMC2585812.
27. Morotti RA, Suchy FJ, Magid MS. Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) type 1, 2, and 3: a review of the liver pathology findings. *Semin Liver Dis.* 2011 Feb; 31(1):3-10. doi: 10.1055/s-0031-1272831. Epub 2011 Feb 22. Review. PubMed PMID: 21344347.
  28. Ohno H, Stewart J, Fournier MC, Bosshart H, Rhee I, Miyatake S, Saito T, Gallusser A, Kirchhausen T, Bonifacino JS. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science.* 1995 Sep 29; 269(5232):1872-5. PubMed PMID: 7569928.
  29. Ohno H, Fournier MC, Poy G, Bonifacino JS. Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem.* 1996 Nov 15; 271(46):29009-15. PubMed PMID: 8910552.
  30. Overeem AW, Li Q, Qiu YL, Carton-García F, Leng C, Klappe K, Dronkers J, Hsiao NH, Wang JS, Arango D, van IJendoorn SCD. A molecular mechanism underlying genotype-specific intrahepatic cholestasis resulting from MYO5B mutations. *Hepatology.* 2019 Nov 21. doi: 10.1002/hep.31002. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31750554.
  31. Qiu YL, Gong JY, Feng JY, Wang RX, Han J, Liu T, Lu Y, Li LT, Zhang MH, ShepsJA, Wang NL, Yan YY, Li JQ, Chen L, Borchers CH, Sipos B, Knisely AS, Ling V, Xing QH, Wang JS. Defects in myosin VB are associated with a spectrum of previously undiagnosed low  $\gamma$ -glutamyltransferase cholestasis. *Hepatology.* 2017 May; 5(5):1655-1669. doi: 10.1002/hep.29020. Epub 2017 Mar 23. Erratum in: *Hepatology.* 2017 Nov; 66(5):1708-1709. PubMed PMID: 28027573; PubMed Central PMCID: PMC5413810.
  32. Qiu YL, Liu T, Abuduxikuer K, Hao CZ, Gong JY, Zhang MH, Li LT, Yan YY, Li JQ, Wang JS. Novel missense mutation in VPS33B is associated with isolated low gamma-glutamyltransferase cholestasis: Attenuated, incomplete phenotype of arthrogryposis, renal dysfunction, and cholestasis syndrome. *Hum Mutat.* 2019 Dec; 40(12):2247-2257. doi: 10.1002/humu.23770. Epub 2019 Sep 3. PubMed PMID:31479177.
  33. Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* 1994 Nov 3; 372(6501):55-63. Review. PubMed PMID: 7969419.
  34. Saba TG, Montpetit A, Verner A, Rioux P, Hudson TJ, Drouin R, Drouin CA. An atypical form of erythrokeratoderma variabilis maps to chromosome 7q22. *Hum Genet.* 2005 Feb; 116(3):167-71. Epub 2004 Nov 25. PubMed PMID: 15668823.
  35. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell.* 1993 Nov 5; 75(3):451-62. PubMed PMID: 8106172.
  36. Smith H, Galmes R, Gogolina E, Straatman-Iwanowska A, Reay K, Banushi B, Bruce CK, Cullinane AR, Romero R, Chang R, Ackermann O, Baumann C, Cangul H, Cakmak Celik F, Aygun C, Coward R, Dionisi-Vici C, Sibbles B, Inward C, Kim CA, Klumperman J, Knisely AS, Watson SP, Gissen P. Associations among genotype, clinical phenotype, and intracellular localization of trafficking proteins in ARC syndrome. *Hum Mutat.* 2012 Dec; 33(12):1656-64. doi: 10.1002/humu.22155. Epub 2012 Aug 6. PubMed PMID: 22753090; PubMed Central PMCID: PMC3746110.
  37. Tornieri K, Zlatic SA, Mullin AP, Werner E, Harrison R, L'hernault SW, Faundez V. Vps33b pathogenic mutations preferentially affect VIPAS39/SPE-39-positive endosomes. *Hum Mol Genet.* 2013 Dec 20; 22(25):5215-28. doi: 10.1093/hmg/ddt378. Epub 2013 Aug 4. PubMed PMID: 23918659; PubMed Central PMCID: PMC3842178.
  38. Van der Velde KJ, Dhekne HS, Swertz MA, Sirigu S, Ropars V, Vinke PC, Rengaw T, van den Akker PC, Rings EH, Houdusse A, van IJendoorn SC. An overview and online registry of microvillus inclusion disease patients and their MYO5B mutations. *Hum Mutat.* 2013 Dec; 34(12):1597-605. doi: 10.1002/humu.22440. Epub 2013 Oct 16. Review. PubMed PMID: 24014347.