

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis genético-molecular del papel de la vía  
endocítica en la ruta de transducción de la señal  
de pH ambiental en *Aspergillus nidulans*.**

**SILVIA HERRANZ FERNANDEZ**

**Madrid, 2013**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis genético-molecular del papel de la vía  
endocítica en la ruta de transducción de la señal  
de pH ambiental en *Aspergillus nidulans*.**

Memoria presentada por Silvia Herranz Fernández para optar al grado de Doctor.

**Director:** Dr. Olivier Vincent  
Científico Titular del CSIC  
Departamento de modelos experimentales de enfermedades humanas  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
C.S.I.C.

**Tutora:** Rosalia Rodríguez  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid







Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (C.I.B.) e Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) del CSIC bajo la dirección del Dr. **Olivier Vincent**, Científico Titular del CSIC, en el departamento de modelos experimentales de enfermedades humanas del IIB.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos de la Dirección general de Investigación a través del proyecto BIO2002-00803 y por una beca F.P.I. del Ministerio de Educación y Ciencia al doctorando **Silvia Herranz Fernández**



El Dr. Olivier Vincent, científico titular del C.S.I.C. en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM

CERTIFICA:

Que Sivia Herranz Fernández, licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección y para la obtención de una Tesis Doctoral el trabajo de investigación titulado

“ANÁLISIS GENÉTICO-MOLECULAR DEL PAPEL DE LA VÍA ENDOCÍTICA EN LA RUTA DE TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE PH AMBIENTAL EN *Aspergillus nidulans*”

CONSIDERA:

Que tanto el trabajo experimental como las conclusiones del mismo reúnen las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 20 de Marzo de 2013.

Fdo: Dr. Olivier Vincent  
Director de la Tesis Doctoral  
Científico Titular del C.S.I.C.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
“Alberto Sols”

Fdo: Dra. Rosalia Rodríguez  
Tutora de la Tesis Doctoral  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid



***Suerte es cuando la preparación y la oportunidad se encuentran.***

***Voltaire***



**A mi madre y a mi padre.**

**A Carlos.**





## AGRADECIMIENTOS

Y por fin llegó el día! Estaba segura de que llegaría, aunque si he de ser completamente sincera ha habido un par de veces en todos estos años en los que he sentido flaquear mis fuerzas. Sin embargo, siempre había alguien ahí para animarme y hacerme coger fuerzas de nuevo. Quiero agradecer sinceramente a todas esas personas que de una forma u otra han tenido algo que ver con esta Tesis.

En primer lugar quiero agradecer de forma especial a Oli, por confiar en mi desde el primer día, por tu paciencia y tus consejos.

Agradecer por un lado a todos los compañeros de mi etapa en el laboratorio de Miguel Ángel Peñalba en el CIB, a Eduardo por sus consejos y charlas sin fin, a Elena, una figura fundamental del laboratorio...que habríamos hecho sin tu ayuda!. A los compañeros con los que conviví y trabajé durante más de dos años , América, Javi, Juanqui, Laura, Olga, Lidia y Antonio, por vuestra ayuda en los momentos más difíciles, y vuestra alegría en los momentos felices, ha sido un placer conocerlos. Por otro lado a la gente con la que coincidí en mi segunda etapa de la tesis, en el IIB, en especial a Josué, Irene, Maria... y Antonio, con el que compartí mi último año de laboratorio.

Quiero agradecer también a toda la gente que me acompaña en mi nueva etapa de trabajo fuera de la investigación. A mis compañeras de “Nacional” Juani, Silvia, Stella, Laura, M<sup>a</sup> Dolores y Lorena, a los comerciales, en especial a Eugenio por darme esos ánimos finales que necesitaba. Gracias por vuestra ayuda en todo momento, por vuestra comprensión y por hacer que me sienta como en mi propia casa.

Para finalizar quiero agradecer a las personas más importantes de mi vida, mi familia:  
A mis sobrinos, Alex, Lucía y Adrián.  
A mis abuelos, Pepe, Ana y Manolo y en especial a Yaya, te echo mucho de menos...por vuestro cariño, vuestra dedicación con nosotros...  
A mis hermanos Sonia y Edu, por vuestra amistad y generosidad...os quiero aunque no os lo diga mucho.  
A mis padres, Manolo y Pili, por vuestro amor incondicional. Todo lo que soy os lo debo a vosotros, no hay palabras suficientes para agradecerlos todo lo que me habéis dado... GRACIAS.  
A Carlos, por aguantarme día a día, por apoyarme y animarme, por hacerme entender que hay que disfrutar de la vida y por darme lo mejor y más bonito de este mundo, Paula y Lucca. OS QUIERO.



## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos.
AD	Dominio de activación.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosina difosfato.
ATP	Adenosina-5'-trifosfato.
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”.
cDNA	Acido desoxirribonucleico codificante.
CTD	Dominio C-terminal.
D.O.	Densidad óptica.
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético.
ESCRT	“Endosomal sorting complex required for transport”.
GDP	Guanina difosfato.
GTP	Guanina trifosfato.
g/l	Gramo/Litro.
GLUE	“GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45”.
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G.
GST	Glutation S-transferasa.
HA	hemagglutinin.
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico.
IPTG	isopropylthio- $\beta$ -galactoside.
LB	Luria Broth.
Mb	Mega bases.
MCA	Medio completo de <i>Aspergillus</i> .
MIM	“MIT interacting motif”.
MIT	“Microtubule-interacting and trafficking”.
MMA	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i> .
MVBs	“Multivesicular bodies”.
NEM	N-Etilmaleimida.
NES	Señal de exportación nuclear.
NLS	Señal de localización nuclear.
NZF	Dominio dedos de zinc.
pb	Par de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PFAM	“Protein Family database”
PI(3)P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
p/v	Peso/volumen.
RNA	Ácido ribonucleico.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
SD	Medio sintético de levaduras.

SDS	Dodecil sulfato sódico.
SNARE	“Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor”.
TCA	Ácido tricloroacético.
TM	Dominio transmembrana.
TNT	Sistema de transcripción/traducción acoplada
TR	Tampón de Ruptura
UEV	“Ubiquitin E2 variant”.
UIM	Motivo que interacciona con ubiquitina.
UTR	Región no traducida.
Vps	“Vacuolar protein sorting”.
v/v	Volumen/volumen.
YPDA	Medio completo de levaduras.
YNB	“Yeast Nitrogen Base”.
2H	Doble híbrido.

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC.

Las tablas y figuras contenidas en este trabajo se citan seguidas de un número que indica el orden que ocupan dentro de la memoria.

# ÍNDICE



<b>RESUMEN EN INGLÉS</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<hr/>	
<b>1.1. BIOLOGÍA DE LOS HONGOS.</b>	<b>7</b>
1.1.1. <i>Aspergillus nidulans</i> .	7
1.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	8
<b>1.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR EL pH AMBIENTAL EN HONGOS.</b>	<b>9</b>
1.2.1. Genes implicados en la ruta de señalización por pH ambiental en <i>Aspergillus nidulans</i> .	9
1.2.1.1. El factor de transcripción PacC.	11
1.2.1.1.1. PacC se activa mediante dos pasos secuenciales de proteólisis.	12
1.2.1.1.2. El procesamiento de PacC regula su localización subcelular.	13
1.2.1.2. Los genes <i>pal</i> : componentes de la ruta de transducción de la señal de pH ambiental.	14
1.2.2. Modelo molecular de regulación de la expresión génica en respuesta al pH ambiental.	15
1.2.3. La ruta de señalización por pH ambiental en otros hongos.	16
1.2.4. Similitudes entre la ruta de señalización por pH ambiental en hongos y la ruta Hedgehog en metazoos.	17
<b>1.3. LA MAQUINARIA ENDOCÍTICA ESCRT</b>	<b>18</b>
1.3.1. Proteínas Vps de clase E.	19
1.3.2. El desensamblaje de los complejos ESCRT requiere de Vps4.	22
<b>1.4. LAS ARRESTINAS: REGULADORES DE RUTAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR.</b>	<b>23</b>
1.4.1. Clasificación.	23
1.4.2. Características estructurales.	24
1.4.3. Localización.	26
1.4.4. Función.	26
 <b>2. OBJETIVOS</b>	 <b>30</b>
<hr/>	
 <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	 <b>31</b>
<hr/>	
<b>3.1. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.</b>	<b>31</b>
3.1.1. Medios y suplementos para <i>Aspergillus nidulans</i> .	31
3.1.1.1. Medio Mínimo de <i>Aspergillus nidulans</i> (MMA).	31
3.1.1.2. Medio completo de <i>Aspergillus nidulans</i> (MCA).	31
3.1.1.3. Soluciones y suplementos para medios de <i>Aspergillus nidulans</i> .	31
3.1.2. Medios y suplementos para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	32
3.1.2.1. Medio Mínimo de levadura (SD).	32
3.1.2.2. Medio Completo de levadura (YPDA).	32
3.1.2.3. YNB 10X pH 4.5.	32
3.1.2.4. Mezcla de aminoácidos.	33
3.1.2.5. Aminoácidos complementarios.	33
3.1.3. Medios para <i>Escherichia coli</i> .	33
<b>3.2. CEPAS DE MICROORGANISMOS UTILIZADAS.</b>	<b>33</b>
3.2.1. Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> .	33
3.2.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	34
3.2.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	35
<b>3.3. VECTORES.</b>	<b>35</b>

3.3.1. Plásmidos utilizados para integración genómica en <i>Aspergillus nidulans</i> .	35
3.3.2. Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas <i>in vitro</i> y en <i>Escherichia coli</i> .	36
3.3.3. Plásmidos utilizados en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	37
3.3.4. Oligonucleótidos.	38
<b>3.4. TÉCNICAS DE <i>Aspergillus nidulans</i>.</b>	<b>39</b>
3.4.1. Crecimiento en medio líquido de <i>Aspergillus nidulans</i> .	39
3.4.2. Crecimiento en medio sólido para análisis fenotípicos.	40
3.4.3. Crecimiento con etanol o glicerol como fuente de carbono.	40
3.4.4. Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i> .	40
3.4.4.1. Integraciones en el locus <i>palA</i> .	41
3.4.4.2. Integraciones en el locus <i>palF</i> .	41
3.4.4.3. Integraciones en el locus <i>argB</i> de construcciones bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa I ( <i>alcA<sup>P</sup></i> ).	41
3.4.5. Extracción de proteínas totales de <i>Aspergillus nidulans</i> .	41
3.4.6. Extracción de ADN genómico de <i>Aspergillus nidulans</i> .	42
3.4.7. Cruces entre cepas de <i>Aspergillus nidulans</i> .	42
<b>3.5 TÉCNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</b>	<b>43</b>
3.5.1. Crecimiento en medio líquido y en medio sólido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	43
3.5.2. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	43
3.5.3. Extracción de ADN genómico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	43
3.5.4. Extracción de proteínas totales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	44
3.5.5. Sistema de doble híbrido	44
<b>3.6. TÉCNICAS GENERALES DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.</b>	<b>45</b>
3.6.1. Inmunoprecipitación con resina acoplada al anticuerpo anti-HA.	45
3.6.2. Coimmunoprecipitación con resina acoplada a proteína A.	45
3.6.3. Tratamientos con proteína fosfatasa del fago lambda.	45
3.6.4. Ensayos de inmunodetección de proteínas (“Western blot”).	45
3.6.5. Ensayos de unión <i>in vitro</i> .	46
<b>3.7. “KITS” DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA.</b>	<b>47</b>

## **4. RESULTADOS** **48**

---

<b>4.1. CONEXIÓN ENTRE LA MAQUINARIA ENDOCÍTICA ESCRT Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL EN <i>Aspergillus nidulans</i>.</b>	<b>48</b>
4.1.1. Caracterización de un mutante <i>vps</i> clase E en <i>Aspergillus nidulans</i> .	48
4.1.1.1. Construcción de una cepa que expresa de forma condicional Vps4 <sup>E232Q</sup> .	49
4.1.1.2. Análisis fenotípico de una cepa que expresa Vps4 <sup>E232Q</sup> .	51
4.1.1.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Vps4 <sup>E232Q</sup> sobre el procesamiento de PacC en respuesta a un cambio de pH.	51
4.1.2. Caracterización de la interacción entre PalA y Vps32.	52
4.1.2.1. La interacción entre PalA y Vps32 es directa.	52
4.1.2.2. Mapeo por doble-híbrido de las regiones interactivas de PalA.	53
4.1.2.3. Interacción entre proteínas con dominio Bro1 y homólogos de Vps32 en otros organismos.	54
4.1.3. Estudio de la interacción de PalA con otras proteínas de la ruta de señalización por pH ambiental.	56
4.1.3.1. Construcción de una cepa que expresa PalA::3MYC.	57
4.1.3.2. Construcción de una cepa que expresa PalA::3MYC y PalB::3HA.	59
4.1.3.3. Análisis de la asociación de PalA, PalB y PacC mediante coimmunoprecipitación.	61
4.1.3.4. Construcción de una cepa <i>pacC209 palA::3MYC palB::3HA</i> .	62



4.1.3.5. Análisis de la asociación de PalA, PalB y PacC <sup>L498S</sup> mediante coinmunoprecipitación.	62
<b>4.2. PalF: UNA PROTEÍNA RELACIONADA CON LAS ARRESTINAS DE MAMÍFEROS.</b>	<b>65</b>
4.2.1. Construcción de una cepa que expresa PalF::3HA mediante reemplazamiento génico.	65
4.2.2. Detección de PalF::3HA mediante ensayos de “Western-blot”.	67
4.2.2.1. Optimización de las condiciones de extracción de PalF.	67
4.2.2.2. Análisis de los niveles de expresión de PalF.	69
4.2.2.3. Efectos del pH ambiental sobre la movilidad electroforética de PalF.	69
4.2.2.4. Fosforilación y ubiquitinación de PalF en respuesta a un incremento del pH ambiental.	70
4.2.3. Fosforilación y ubiquitinación de PalF en los mutantes <i>pal</i> .	71
4.2.3.1. Construcción de cepas mutantes <i>pal</i> que expresan PalF::3HA	71
4.2.3.2. Modificaciones postraduccionales de PalF en los mutantes <i>pal</i> .	72
4.2.3.3. Efecto de la mutación <i>pacC</i> <sup>63</sup> sobre PalF.	73
4.2.3.4. Análisis de la posible implicación de los mecanismos de señalización mediados por calcio en la regulación de las modificaciones postraduccionales de PalF.	75
<b>4.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA RUTA RIM EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.</b>	<b>76</b>
4.3.1. La ruta RIM se activa en respuesta a un incremento del pH ambiental.	76
4.3.1.1. Construcción de cepas que expresan Rim101::3HA	76
4.3.1.2. Rim101 se procesa en respuesta a un incremento de pH ambiental.	78
4.3.2. Estudio del homólogo de PalF en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Rim8.	79
4.3.2.1. Detección de Rim8::3HA mediante ensayos de “Western-blot”.	79
4.3.2.2. Fosforilación de Rim8::3HA.	80
4.3.2.3. Ubiquitinación de Rim8::HA.	81
 <b>5. DISCUSIÓN</b>	 <b>83</b>
<hr/>	
<b>5.1. ANÁLISIS DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL EN HONGOS.</b>	<b>84</b>
<b>5.2. CONEXIÓN ENTRE LA VÍA ENDOCITÓTICA Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL: EL COMPLEJO ESCRT-III.</b>	<b>85</b>
5.2.1. Interacción directa entre PalA y Vps32 en <i>Aspergillus nidulans</i> y entre sus homólogos en otros organismos.	85
5.2.2. Efecto del mutante dominante negativo Vps4 <sup>E232Q</sup> sobre la ruta de señalización por pH ambiental en <i>Aspergillus nidulans</i> .	86
<b>5.3. PalA COMO ANDAMIAJE PARA LA PROTEASA PROCESATIVA PalB.</b>	<b>88</b>
<b>5.4. POSIBLE CONEXIÓN ENTRE LA VÍA ENDOCÍTICA Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL A NIVEL DE LA PROTEÍNA PalF/Rim8.</b>	<b>88</b>
5.4.1. PalF/Rim8, una proteína homóloga a las arrestinas de mamíferos.	89
5.4.2. Regulación de PalF/Rim8.	89
5.4.3. Modificaciones postraduccionales.	90
5.4.4. Componentes necesarios de la ruta <i>pal</i> para que se produzcan las modificaciones postraduccionales en PalF.	91
<b>5.5. ACTUALIZACIÓN DEL MODELO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA AL pH AMBIENTAL EN <i>Aspergillus nidulans</i>.</b>	<b>91</b>
 <b>6. CONCLUSIONES</b>	 <b>94</b>
<hr/>	
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>95</b>
<hr/>	



## **RESUMEN EN INGLÉS**



## RESUMEN EN INGLÉS

**Introduction**

Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeast is mediated by the *pal/RIM* signaling pathway and the transcription factor PacC/Rim101. The ambient pH signaling pathway is conserved in the fungal kingdom and has been mainly studied in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* and in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, although several studies have also been carried out in the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Candida albicans*<sup>45</sup>. Ambient pH signal transduction involves the products of the *pal* genes and the transcription factor PacC in *A. nidulans*, and the corresponding *RIM* homologs in *S. cerevisiae*. The *pal/RIM* signaling pathway is activated in response to external pH increase. In response to this signal, the PacC transcription factor in *A. nidulans* and Rim101 in *S. cerevisiae* are activated by proteolytical processing<sup>17,53</sup>. Studies carried out in *A. nidulans* showed that the proteolytical processing of the transcription factor regulates its nucleo-cytoplasmic localization<sup>31</sup>. The molecular mechanisms involved in the transduction of the ambient pH signal are highly conserved among fungi. The different components of the *pal/PacC* signaling pathway in *A. nidulans* have their corresponding homologs in the *RIM* pathway in *S. cerevisiae*. The putative ambient pH-sensing complex contains a protein with 7 transmembrane domains (7TM), PalH in *A. nidulans*<sup>20</sup>. In *S. cerevisiae*, two PalH homologs, Rim21 and Dfg16, have been reported, and both are required for pH signaling<sup>57</sup>. Besides these 7TM proteins, there is a 3TM protein, which is also involved in pH signal reception: PalI in *A. nidulans* and its homolog Rim9 in *S. cerevisiae*<sup>21,39</sup>. Other two main components of the signaling pathway, PalA and PalB in *A. nidulans* and their respective homologs Rim20 and Rim13 in *S. cerevisiae*, are likely involved in the proteolytical processing of the transcription factor. PalB/Rim13, which is predicted to be, by sequence analysis, a cysteine protease of the calpain family, appears to be responsible for the pH-dependent proteolytic processing of PacC/Rim101<sup>22,28,41</sup>, whereas the proteasome would be responsible for a second proteolytical cleavage in PacC<sup>34</sup>. PalA/Rim20 contains a Bro1 domain and interacts with the transcription factor PacC/Rim101<sup>40,55</sup>. PalA recognizes two YPXL/I motifs in PacC, located at each side of the first proteolytical cleavage site, and the interaction of PalA with PacC is required for this first proteolytic processing step, presumably catalyzed by PalB<sup>40</sup>. A second protein with a Bro1 domain, PalC in *A. nidulans* and its homolog Ygr122w in *S. cerevisiae*, appears to have a function in the signal transduction from the pH sensor to the complex involved in proteolytic processing of the transcription factor<sup>38</sup>. Finally, our previous work in *A. nidulans* showed that the last component of this pathway, PalF (Rim8 in *S. cerevisiae*), interacts with the C-terminal cytoplasmic tail of the 7TM protein PalH.

Previous studies uncovered an unexpected link between ambient pH signaling and the endocytic pathway in fungi. PalA, and its yeast ortholog Rim20, were shown to interact in the two-hybrid system with Vps32 (Snf7), a component of the ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) machinery, which plays an essential role in multivesicular body (MVB) formation<sup>40,75,156</sup>. MVB results from the maturation of the late endosome by invagination of vesicles that contain membrane proteins from Golgi or the plasma membrane, en route to be processed or degraded in the vacuole. The fusion of the MVB membrane with that of the vacuole allows the discharge of these vesicles into the vacuole lumen and the proteolyses of its content. The formation of these vesicles by invagination of the endosome membrane requires a multi-protein complex, with several sub-complexes, ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III that associate to the endosome membrane<sup>82</sup>. Snf7, a

## RESUMEN EN INGLÉS

component of the ESCRT-III complex, recruits Bro1, a protein of the PalA/Rim20 family, which acts as an adaptor for the Doa4 deubiquitinase<sup>103</sup>.

A second possible link between ambient pH signaling and the endocytic pathway is that PalF shares sequence similarities with mammalian arrestins. Arrestins were originally discovered by virtue of their ability to bind to activated 7TM receptors, leading to desensitization of these receptors<sup>120</sup>. This regulatory mechanism uncouples receptors from heterotrimeric G proteins and inactivates the corresponding signaling pathway. It was discovered later on that these proteins play important additional functions and act as adaptors in several processes<sup>149</sup>. On one hand, they are involved in the activation of alternative signaling pathways, such as MAP kinases pathway, by mediating the recruitment of components of these signaling pathways to the activated receptors. Most importantly, they play a key role in endocytosis of 7TM receptors since they work as adaptor between these receptors and the endocytic machinery. The internalization by endocytosis of activated 7TM receptors lead to the dephosphorylation, resensitization and recycling of these receptors to the plasma membrane or their traffic and degradation in the lysosome. Arrestins play a key role in this process by mediating the interaction between the activated and phosphorylated receptor and several components of the endocytic machinery including clathrin and clathrin adaptor AP2<sup>137,138</sup>. The adaptor function of arrestins is based on their ability to interact with other proteins once bound to the 7TM receptor. Several studies indicate that the interaction with the activated and phosphorylated receptor produces a conformational change in the arrestin and allows the interaction of other proteins with inaccessible domains in its inactive conformation<sup>121</sup>. However, this conformational change is not the only mechanism that regulates arrestin function in 7TM receptors endocytosis. It has also been demonstrated that phosphorylation/dephosphorylation and ubiquitination of arrestins play a key role in this process. For example, the beta-arrestin 1 is constitutively phosphorylated in a serine residue closed to the clathrin binding site. Arrestin dephosphorylation in response to 7TM receptor activation is a requirement for clathrin binding and allows receptor endocytosis<sup>141</sup>. Arrestin ubiquitination in response to 7TM receptor activation is another key regulatory mechanism involved in receptor endocytosis<sup>144</sup>.

PalF shares with mammal arrestins both sequence similarities and the ability to interact with the cytoplasmic domains of 7TM proteins. We thus hypothesized that PalF could, as mammalian  $\beta$ -arrestins, function as an endocytic adaptor, thus providing a second possible link between ambient pH signaling and the endocytic pathway.

## Results

To investigate the link between the pH regulatory system and endocytosis in *A. nidulans*, we first tested the effect on pH signaling of a *vps* class E mutation that inactivates the ESCRT endocytic machinery and hence inhibits protein trafficking toward the vacuole in other organisms. Our initial attempts to disrupt the *vps32* gene, which encodes a component of ESCRT-III, were unsuccessful. We then used an alternative approach to construct a *vps* class E mutant. We first cloned the *vps4* gene and generated a dominant negative mutant of this gene (*vps4*<sup>E232Q</sup>), which prevents the dissociation of ESCRT in other organisms. *vps4*<sup>E232Q</sup> was placed under the control of *alcA* promoter, which is repressed by glucose and strongly induced by ethanol. This construct was integrated into the *A. nidulans* genome and the resulting strain was further characterized. Our results show that the conditional expression of the dominant negative mutant Vps4<sup>E232Q</sup> inhibits growth of *Aspergillus nidulans* but does not block the proteolytic processing of the transcription factor PacC in response to the pH signal.

To further investigate the relation between the pH signaling pathway and the ESCRT endocytic machinery, we characterized the interaction between PalA and the ESCRT-III subunit Vps32. Previous studies showed that PalA interacts with Vps32 in two-hybrid assays. We then tested whether this interaction is direct and does not involve additional proteins by using *in vitro* binding assays. Vps32 was expressed as a glutathione S-transferase (GST) fusion protein in *Escherichia coli* and was purified by use of glutathione sepharose beads, and PalA was synthesized and radiolabeled *in vitro*. Pull down assays showed that PalA directly binds to Vps32. We further characterized this interaction by mapping the PalA domain that mediates Vps32 binding in the two-hybrid system. Our results demonstrate that PalA C-terminal region, which binds to the PacC transcription factor, does not interact with Vps32. In contrast, the PalA N-terminal region, which contains the Bro1 domain, interacts with Vps32, thus showing that PalA acts as an adaptor protein between PacC and Vps32. We extended this analysis by testing in pull down assays whether Bro1 domain containing proteins from other organisms also directly bind to Vps32 homologs. Rim20 and Bro1 from *S. cerevisiae*, as well as EhADH112 from *Entamoeba histolytica*, were *in vitro* synthesized and radiolabeled. Vps32 homologs were expressed and purified as GST fusion proteins from *E. coli*. Pull down assays showed that Rim20 and Bro1 directly bind to Snf7/Vps32 and that EhADH112 also binds to EhVps32. In agreement with our previous results in *A. nidulans*, we also found that the N-terminal half of EhADH112, which contains the Bro1 domain, mediates EhVps32 *in vitro* binding.

Because PalA binding to the PacC transcription factor is required for its proteolytic processing, presumably catalyzed by PalB, we sought to purify the corresponding protein complex from *A. nidulans* grown in acidic or alkaline conditions. We first introduced a triple MYC epitope tag at the *palA* C-terminus and integrated this construct in the *A. nidulans* genome. We then crossed this transformant with a strain that expresses triple HA epitope tagged PalB. A segregant that expresses both PalA-3MYC and PalB-3HA was used in coimmunoprecipitation experiments from total protein extracts. Immunoprecipitation of PalA-3MYC with anti-MYC antibody shows that PalB-3HA and PacC, detected with anti-HA and anti-PacC antibodies respectively, do not form a soluble complex with PalA in protein extracts from *A. nidulans* grown in either acidic or alkaline conditions. We hypothesized that this result could be due to the transient nature of these protein-protein interactions, which are lost once PacC is processed. Thus, we performed an additional cross with a strain carrying a *pacc* mutation that prevents its proteolytic processing. Coimmunoprecipitation experiments were carried out with a segregant containing the *pacc* mutation and expressing both PalA-3MYC and PalB-3HA. Even in these conditions, we were unable to coimmunoprecipitate PalA, PalB and PacC, thus suggesting that this protein complex may not be present in the soluble fraction of total protein extracts.

To investigate the second possible link between ambient pH signaling and the endocytic pathway in *A. nidulans*, we examined the mechanisms involved in the regulation of PalF, another component of the ambient pH signaling pathway. Multiple sequence alignments of PalF and its homologs in other fungi revealed the presence of arrestin N-terminal and C-terminal domains. In addition, PalF, as mammalian arrestins, binds to the cytoplasmic domain of a 7TM protein, PalH. We first introduced a triple HA epitope tag into the PalF region corresponding to the loop connecting  $\beta$ -strand 9 and 10 in bovine visual arrestin, and integrated this plasmid construct in the *A. nidulans* genome. Western blot analysis with an anti-HA antibody showed that PalF protein levels are about 10 fold lower than those of PalB. Lambda phosphatase treatment of PalF immunoprecipitates showed that PalF is a phosphoprotein. In addition, Western blot analysis of these immunoprecipitates with an anti-ubiquitin antibody showed that PalF is also ubiquitinated. We found that both phosphorylation and

## RESUMEN EN INGLÉS

ubiquitination of PalF are dependent on the pH signal. We then tested whether the other components of the ambient pH signaling pathway are required for PalF phosphorylation and ubiquitination. We crossed the wild-type strain expressing PalF-3HA with *palH*, *palI*, *palC*, *palA* and *palC* mutant strains, and isolated a *pal* mutant segregant expressing PalF-3HA. Western blot analysis of total protein extracts showed that PalF phosphorylation and ubiquitination are fully dependent on PalH, partially dependent on PalI, and independent on the other components of the *pal* pathway, PalA, PalB and PalC. Thus, PalH and PalI act upstream of PalF whereas PalA, PalB and PalC act downstream in the pH signaling pathway. By performing additional crosses with other genetic backgrounds, we showed that expression of a constitutively active form of the PacC transcription factor (*pacCc63*) does not alter the expression levels and post-translational modifications of PalF. This result suggests that, unlike what happens in *S. cerevisiae*, there is no negative feedback regulation loop between PalF and PacC in *A. nidulans*. Additionally, we found that a drastic reduction in calcium levels in the cell does not affect the pH-dependent phosphorylation of PalF.

Finally, we addressed whether the molecular mechanisms mediating PalF regulation are conserved in the yeast *S. cerevisiae*. We first integrated a RIM101-3HA construct in the *S. cerevisiae* genome and showed by Western blot analysis that Rim101 processing is very fast upon ambient pH increase and requires all the component of the *RIM* pathway. We then introduced a triple HA epitope tag in the yeast *palF* homolog, *RIM8*. Western blot experiments and lambda phosphatase assays showed that Rim8, as PalF, is both phosphorylated and ubiquitinated.

### Conclusions

Our first characterization of a *vps* class E mutation in *A. nidulans* indicates that the dissociation of the ESCRT machinery by Vps4, which plays an essential role in protein trafficking toward the vacuole in all eukaryotic organisms, is required for *A. nidulans* viability but is not necessary for transduction of the pH signal. Moreover, we further characterized the interaction between PalA and the ESCRT-III subunit Vps32 and showed that the N-terminal region of PalA, which contains a Bro1 domain, directly binds to Vps32. We also found that other proteins with a Bro1 domain such as yeast proteins Rim20 and Bro1, and *Entamoeba histolytica* EhADH112, also bind directly to Vps32 homologues. Thus, one of the features of Bro1 domain containing proteins is to interact with the ESCRT-III component Vps32.

Our attempts to coimmunoprecipitate PalA, PalB and PacC from total protein extracts failed, even in conditions in which PacC processing is impaired. The difficulty in purifying this complex could be owed to its association with the endosomal membrane associated ESCRT machinery.

Additionally, we showed that PalF, which binds to the 7TM protein and putative pH sensor PalH, is like mammalian  $\beta$ -arrestins, phosphorylated and ubiquitinated in a pH signal- and 7TM protein-dependent manner. Thus, PalF is the first experimentally documented fungal arrestin-related protein, dispelling the notion that arrestins are restricted to animal proteomes. Epistatic analysis demonstrate that PalF posttranslational modifications are also partially dependent on the 3TM protein PalI but independent of the remaining pH signal transduction pathway proteins PalA, PalB, and PalC, yielding experimental evidence bearing on the order of participation of the six components of the pH signal transduction pathway. Our data strongly implicate PalH as an ambient pH sensor, possibly with the cooperation of PalI.



Finally, we examined the evolutionary conservation of the ambient pH signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and showed that Rim101, as PacC, is processed very fast upon ambient pH increase and that Rim8, the PalF homologue, is both phosphorylated and ubiquitinated. In view of the role that phosphorylation and ubiquitination of  $\beta$ -arrestins play in receptor endocytosis in mammals, these findings are consistent with a model involving the endocytic pathway in transduction of the pH signal in fungi.



# **INTRODUCCIÓN**



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 BIOLOGIA DE LOS HONGOS.

Los hongos son seres eucariotas, en muchos casos multinucleados, que se reproducen por medio de esporas, móviles o inmóviles, sexuales o asexuales. Son heterótrofos, sin clorofila, y se alimentan por absorción (raramente por fagocitosis, como es el caso de los hongos ameboides). Los hongos son cosmopolitas, pueden aparecer prácticamente en cualquier sitio, y alimentarse de lo más insospechado. El talo (soma o cuerpo vegetativo) puede ser unicelular o típicamente filamentoso, y está recubierto de una pared de quitina o de celulosa. Casi todos son organismos aerobios, aunque algunas levaduras son anaerobias facultativas, y hay algunos que son fermentadores obligados. En este estudio, hemos utilizado dos tipos de hongos, ambos *Ascomycetes*, un hongo filamentoso: *Aspergillus nidulans*, de la familia *Trichocomaceae* y un hongo levaduriforme: *Saccharomyces cerevisiae*, de la familia *Saccharomycetaceae*.

#### 1.1.1. *Aspergillus nidulans*.

*Aspergillus nidulans* es un organismo normalmente haploide que presenta un tipo de crecimiento polarizado formando largos filamentos llamados hifas, con ramificaciones laterales que dan lugar al micelio. Las hifas, están segmentadas mediante tabiques o septos perforados que permiten el tránsito de nutrientes y efectores entre las distintas células.

Este hongo tiene tres fases en su ciclo de vida (detallados en la Figura 1): asexual, sexual y parasexual<sup>1,2</sup>. En su ciclo de vida vegetativo, el hongo se reproduce a través de conidiosporas. Estas esporas dan lugar a la formación de hifas tubulares que crecen de manera hiperpolarizada por extensión apical y ramificación lateral, formando un entramado de hifas interconectadas denominado micelio<sup>1</sup>. Las conidiosporas son esporas asexuales haploides con un solo núcleo, que comparten la misma dotación genética que el micelio y que proceden de unas estructuras especializadas denominadas conidióforos. El micelio del hongo se expande formando colonias de forma radial y necesita de al menos 18 horas de crecimiento para alcanzar la plena competencia y comenzar a producir las estructuras de esporulación asexual<sup>3</sup>.

El ciclo de vida sexual tiene lugar generalmente bajo condiciones de crecimiento adversas y se produce a través del crecimiento de unos cuerpos fructíferos denominados cleistotecios en cuyo interior encontramos unos sacos o ascas que contienen las ascosporas (espora sexual haploide que contiene dos núcleos idénticos procedentes de una mitosis sin división celular)<sup>4</sup>. *A. nidulans* puede atravesar también un ciclo parasexual, en el que se forma una estirpe diploide producto de la anastomosis de hifas de una misma estirpe o estirpes diferentes y posterior fusión de los núcleos. El ciclo parasexual se completa con la haploidización del diploide.

En los cultivos en medio líquido y con suficientes requerimientos nutricionales (como es el caso de los cultivos realizados en este trabajo), *A. nidulans* permanece en estado vegetativo y no induce diferenciación<sup>5</sup>.

*A. nidulans* es uno de los hongos filamentosos considerado como organismo modelo. La conservación entre *Aspergillus* y metazoos de ciertos procesos enzimáticos y de determinadas rutas de biogénesis y de degradación ha permitido la identificación de genes implicados en enfermedades metabólicas humanas de origen genético<sup>6</sup>.

El genoma de *A. nidulans* se publicó en diciembre de 2005 y contiene 30,06 Mb organizadas en ocho cromosomas y un número mínimo estimado de 10.000 genes<sup>7</sup>.

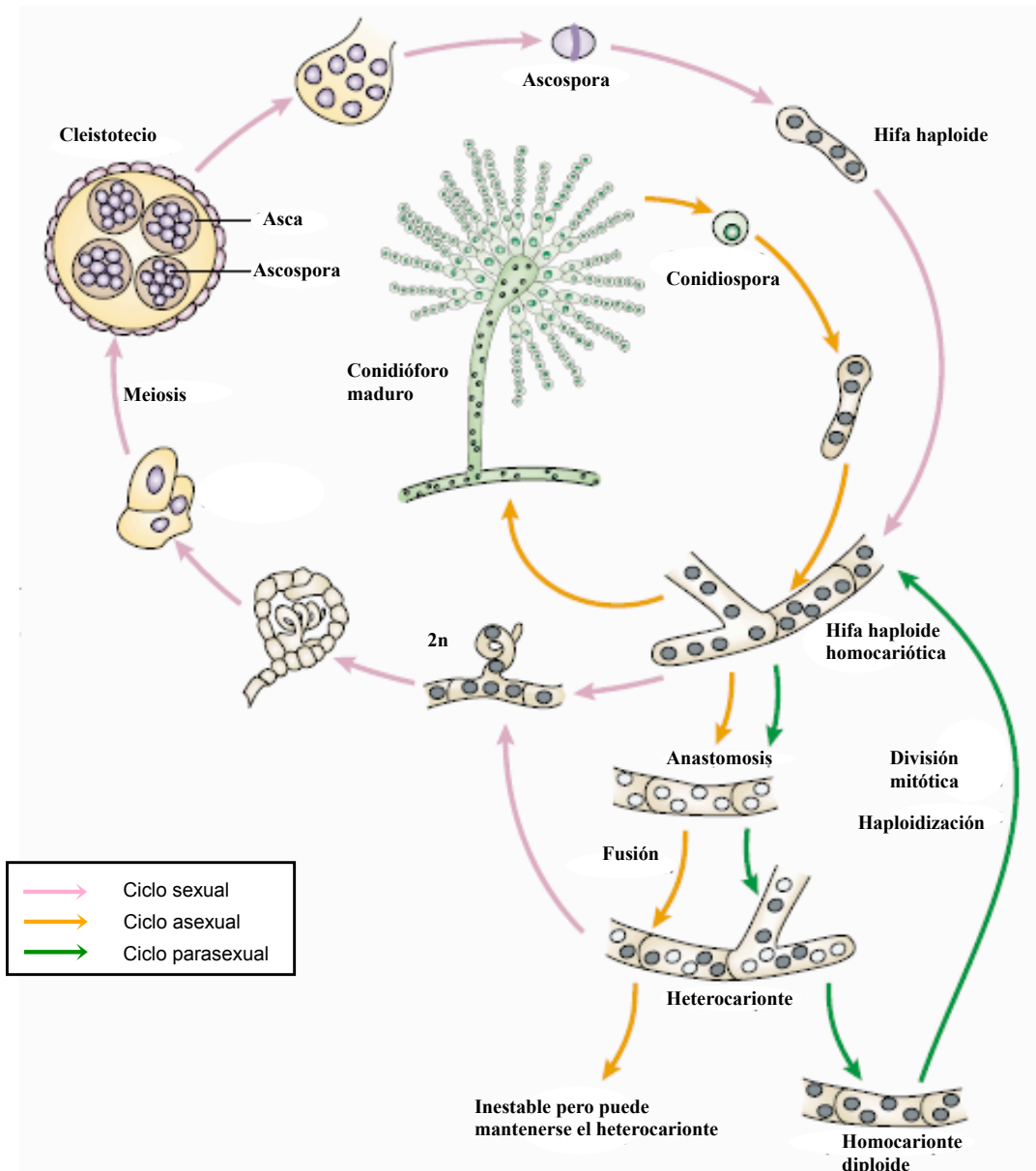


Figura 1. Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Esquema que muestra las distintas fases del ciclo de vida.

### 1.1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* (el microorganismo eucarionte más estudiado) es una levadura muy conocida por sus diferentes aplicaciones en el ámbito alimentario. Es un organismo unicelular que presenta dos ciclos biológicos: reproducción asexual por gemación, que es la más común, y la reproducción sexual, que se induce en condiciones especiales. Esta levadura crece de forma óptima a pH ácido y tiene una dotación genética de 16 cromosomas.

Desde el punto de vista científico, el estudio de las levaduras como modelo biológico ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular, así como a estudiar a nivel molecular los procesos que tienen lugar en las células eucariotas. Por ejemplo, los trabajos realizados en diferentes organismos han puesto de manifiesto que en todos los eucariotas, desde los organismos pluricelulares

más complejos hasta los eucariotas más simples como las levaduras, el ciclo celular se rige por los mismos principios generales y que las proteínas clave en este proceso han sido fuertemente conservadas durante la evolución.

En el ciclo sexual, una célula diploide (célula con dos conjuntos de cromosomas y por consiguiente con dos dotaciones de genes) da lugar a dos ascas o células esporogéneas, que contienen cuatro ascosporas haploides (células con una sola dotación cromosómica y de genes). Las ascosporas son de dos tipos sexuales: “a” y “α”. Cada tipo puede desarrollar células haploides por gemación. La unión de una célula haploide “a” con otra “α” da lugar a una célula normal diploide a/α. Las células “a” producen el “factor a”, que es una feromona peptídica que indica la presencia de células de ese mismo tipo a células del sexo opuesto. Las células “a” no responderán en ningún caso al “factor a”, pero sí lo harán si en las inmediaciones existe “factor α”. Este tipo de respuesta desencadena la formación de una protuberancia en las células hacia la fuente de las feromonas de sexo contrario y es recíproco. En la actualidad se conocen las bases moleculares que rigen este comportamiento, el cual se debe a la activación o represión de la transcripción de determinados genes en los dos tipos sexuales de levaduras. (revisado en <sup>8</sup>).

## 1.2. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR EL pH AMBIENTAL EN HONGOS

Los hongos son unos microorganismos extraordinariamente versátiles, capaces de afrontar las constantes variaciones biológicas y físico-químicas del medio, pudiendo así vivir en ambientes muy diversos y crecer en un amplio rango de valores de pH ambiental. Esto es debido, por un lado, a un eficiente mecanismo homeostático que mantiene el pH intracelular constante y por otro, a un mecanismo regulador de la expresión génica que asegura que las distintas permeasas, enzimas extracelulares y metabolitos secretados se sinteticen sólo a su pH óptimo de actuación. La versatilidad de *A. nidulans* hace que pueda vivir en un rango de pH que va desde 2,5 hasta 10,5, lo que implica una respuesta muy gradual al pH <sup>9</sup>. Esta característica junto al hecho de que los fenotipos de los mutantes relacionados sean muy claros explica por qué se inició el estudio del sistema de regulación por pH en este hongo. Los genes que se expresan preferentemente a pH ácido han sido denominados genes “ácidos”, como por ejemplo los que codifican la permeasa de GABA (*gabA*), o la fosfatasa ácida (*pacA*) <sup>10</sup>. Los genes que se expresan preferentemente a pH alcalino han sido denominados genes “alcalinos”, como el gen de la fosfatasa alcalina *palD* o los genes *acvA* e *ipnA*, que codifican para la δ-(L-α-aminoadipil)-L-cisteinil-D-valina sintetasa y la isopenicilina N-sintasa, respectivamente, las dos primeras enzimas de la ruta de biosíntesis de la penicilina <sup>11-13</sup>.

### 1.2.1. Genes implicados en la ruta de señalización por pH ambiental en *Aspergillus nidulans*.

Los primeros experimentos, que más tarde permitirían identificar el sistema regulador por pH ambiental en *A. nidulans*, fueron realizados por Dorn en 1965, quien identificó y aisló un gran número de mutaciones que afectaban a la actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas <sup>14,15</sup>. Posteriormente, la caracterización de estos mutantes llevó a la identificación de los genes implicados en la ruta de señalización por pH ambiental en *A. nidulans*. El regulador clave de la expresión génica en respuesta a la alcalinización del medio en *A. nidulans* es el factor de transcripción PacC <sup>10,16-18</sup>. Además de *pacC*, otros 6 genes denominados *pal* están implicados en la regulación de la expresión génica por pH: *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* y *palI* <sup>10,19-24</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Las mutaciones que alteran la respuesta a pH pueden ser de tres tipos y están resumidas en la tabla 1:

**1.- Mutaciones de mimesis de acidez:** son las mutaciones que, independientemente del pH ambiental, dan lugar a un patrón de expresión génica similar al de una cepa silvestre cultivada en condiciones ácidas. Son mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los siete genes indicados anteriormente y su fenotipo se caracteriza por un crecimiento nulo o reducido a pH alcalino, hipersensibilidad a molibdato sódico e hiperresistencia a neomicina.

**2.- Mutaciones de mimesis de alcalinidad:** son las mutaciones que, independientemente del pH ambiental, dan lugar a un patrón de expresión génica similar al que presentaría una cepa silvestre cultivada a pH alcalino. Son mutaciones de ganancia de función en *pacC* (*pacC<sup>c</sup>*), epistáticas a las mutaciones de pérdida de función en cualquiera de los genes *pal*. Este tipo de mutaciones provocan hipersensibilidad a neomicina e hiperresistencia a molibdato (fenotipo totalmente opuesto a las mutaciones de mimesis de acidez).

**3.- Mutaciones de mimesis de neutralidad:** son mucho menos abundantes, y producen un patrón de expresión génica, independientemente del pH ambiental, similar al de una cepa silvestre creciendo en condiciones de pH 6,5. Son mutaciones en *pacC*, que se denotan como *pacC<sup>cl-</sup>*. Tienen una mezcla de características entre las de mimesis de acidez y las de mimesis de alcalinidad ya que se produce la expresión simultánea de “genes ácidos” y “genes alcalinos”.

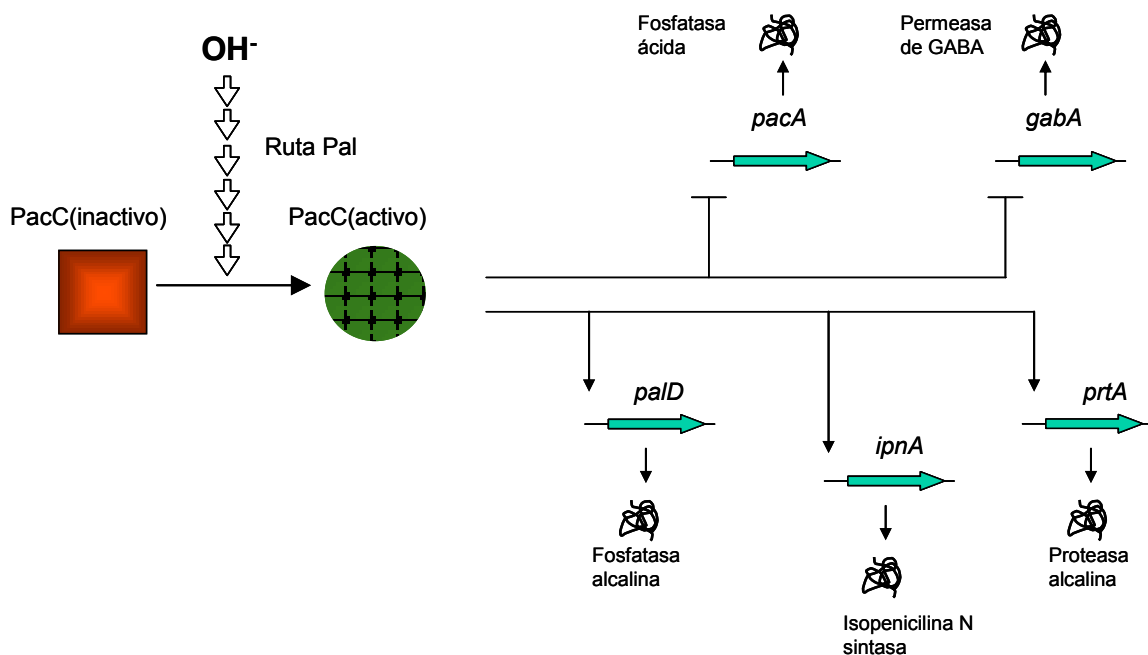
<i>Fenotipo</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Crecimiento</i>	<i>Crecimiento</i>	<i>Crecimiento en medio con:</i>	
		<i>a 25°C</i>	<i>a pH 8.0</i>	<i>molibdato</i>	<i>neomicina</i>
Silvestre	<i>pacC<sup>+</sup></i>	+++	++	+	+
Mimesis de acidez	<i>ΔpacC pacC</i>	-	-	-	+++
	<i>pacC<sup>+/-</sup> pal<sup>-</sup></i>	+++	-	-	+++
Mimesis de alcalinidad	<i>pacC<sup>c</sup></i>	+++	+++	++	-
Mimesis de neutralidad	<i>pacC<sup>cl-</sup></i>	+++	++	++	++

**Tabla 1. Características fenotípicas asociadas a las mutaciones en los genes *pal* y en el gen *pacC*.** Los fenotipos corresponden a crecimiento en medio sólido (MMA) suplementado con los requerimientos adecuados. El medio está tamponado a pH 6,5, excepto para el crecimiento a pH 8,0 e incubado a 37°C. La clasificación del crecimiento oscila entre ausencia total de crecimiento (-) y crecimiento vigoroso (+++), donde la tasa de crecimiento aumenta o disminuye según lo hacen los signos +.

En *pacC* se aislaron mutaciones de los tres tipos mientras que en los genes *pal*, sólo se obtuvieron mutaciones de mimesis de acidez, siendo estas indistinguibles fenotípicamente entre sí y no aditivas. La excepción es *pall*, que tiene un fenotipo similar al de mutaciones de pérdida de función parcial en los otros genes *pal*. Las mutaciones en los seis genes *pal* son, en todos los casos, recesivas e hipostáticas a la gran mayoría de mutaciones en *pacC*. Todos estos datos genéticos y fenotípicos demostraron que *pacC* actúa por debajo de los seis genes *pal*, los cuales participan en un proceso común formando parte de la vía de transducción de la señal que activa PacC en respuesta a la alcalinización del medio. Una vez activado, PacC reprime la expresión de los



genes “ácidos” (*pacA* y *gabA* en la Figura 2) y activa la de los genes “alcalinos” (*palD*, *ipnA* y *prtA* en la Figura 2), mientras que si PacC se mantiene inactivo (en un medio de pH ácido), no se reprimen los genes ácidos, permitiendo su expresión, y no se activan los genes alcalinos.



**Figura 2. Modelo genético de la regulación por el pH ambiental en *A. nidulans*.** El factor de transcripción PacC se traduce como un producto inactivo. En respuesta a la señal de pH alcalino, a través de la ruta *pal*, PacC se activa. PacC activo es un represor de “genes ácidos”, como *pacA* y *gabA*, y un activador de “genes alcalinos” como *palD*, *ipnA* y *prtA*. Reproducido de <sup>25</sup>.

### 1.2.1.1. El factor de transcripción PacC

El gen *pacC* fue clonado y caracterizado por Tilburn y col. <sup>18</sup>. El inicio de la traducción comienza en la Metionina 5, pero la numeración de los codones se hace desde la Metionina del codon 1 para evitar confusiones con los trabajos anteriores a 1999.

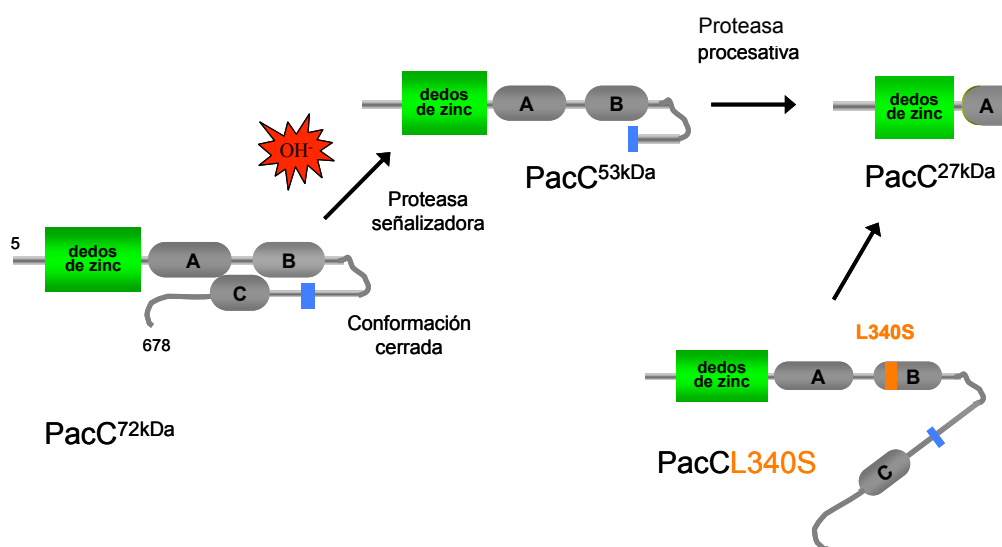
El gen *pacC* codifica para un factor de transcripción cuyo producto de traducción da lugar a una proteína de 72 Kda que contiene 674 aminoácidos. Esta proteína contiene un dominio de unión al ADN (residuo 78 al 169) compuesto por 3 dedos de zinc de tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> que reconoce la secuencia consenso 5'-GCCARG (donde R es una purina) <sup>16,18</sup>. Esta región de los dedos de zinc está muy conservada en hongos incluyendo basidiomicetes y ascomicetos, mientras que otras regiones de la proteína solo están conservadas entre hongos más cercanos filogenéticamente <sup>26,27</sup>. La interacción de PacC, a través de los dedos de zinc, con el ADN ha sido estudiada en profundidad mediante una gran variedad de técnicas genéticas, bioquímicas y de modelado por ordenador <sup>13,16</sup>. Sabemos que el primer dedo de zinc de PacC interacciona con el segundo dedo y éste a su vez une el residuo 5' del sitio de unión del ADN, mientras que el tercer dedo de zinc une el residuo 3' del sitio de unión del ADN.

## INTRODUCCIÓN

### 1.2.1.1.1. PacC se activa mediante dos pasos secuenciales de proteólisis.

Existen tres formas fisiológicas de PacC, denominadas PacC<sup>72</sup>, PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup>, según sus pesos moleculares estimados<sup>17,28</sup>. PacC<sup>72</sup> corresponde al producto primario de traducción de la secuencia codificante de PacC y la forma mayoritaria a pH ácido. PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup> provienen de cortes proteolíticos secuenciales de la parte C-terminal de PacC<sup>72</sup><sup>17,28</sup>.

En condiciones de crecimiento a pH ácido, PacC se encuentra en su forma sin actividad transcripcional descrita y considerada inactiva, PacC<sup>72</sup>. Esto es debido a su conformación “cerrada” promovida por interacciones intramoleculares entre los tres dominios, A, B y C (Figura 3), y por lo tanto inasequible a la proteasa procesativa<sup>29</sup>. En respuesta a un incremento de pH, y de forma dependiente de la integridad de la ruta *pal*, se produce el primer corte proteolítico por la proteasa señalizadora, probablemente PalB<sup>22,29,30</sup>. Este es el único corte regulado por el pH del medio y se produce en la “caja señalizadora”, una secuencia diana formada por 24 aminoácidos y situada entre los residuos 479 y 502 de PacC<sup>72</sup>. El estudio detallado de dicha caja reveló el papel crucial del residuo Leu 498 en la formación de PacC<sup>53</sup><sup>28</sup>. Este corte elimina aproximadamente 180 residuos del extremo C-terminal de PacC<sup>72</sup>, dando lugar a PacC<sup>53</sup>, una proteína de 495 residuos<sup>28</sup>. No se sabe si PacC<sup>53</sup> es transcripcionalmente activa, pero se localiza preferentemente en el núcleo<sup>31</sup>.



**Figura 3. Esquema en el que se muestran las distintas formas de PacC.** Los tres dominios de interacción intramolecular A, B y C se muestran en gris, los dedos de zinc en verde, y la caja de la proteasa señalizadora en azul. El primer corte lo lleva a cabo la proteasa señalizadora que depende de la señal de pH, mientras que el segundo corte es independiente del pH y lo lleva a cabo una proteasa procesativa. La sustitución L340S en PacC genera una forma abierta y accesible a la proteasa procesativa dando lugar directamente a la forma PacC<sup>27</sup>.

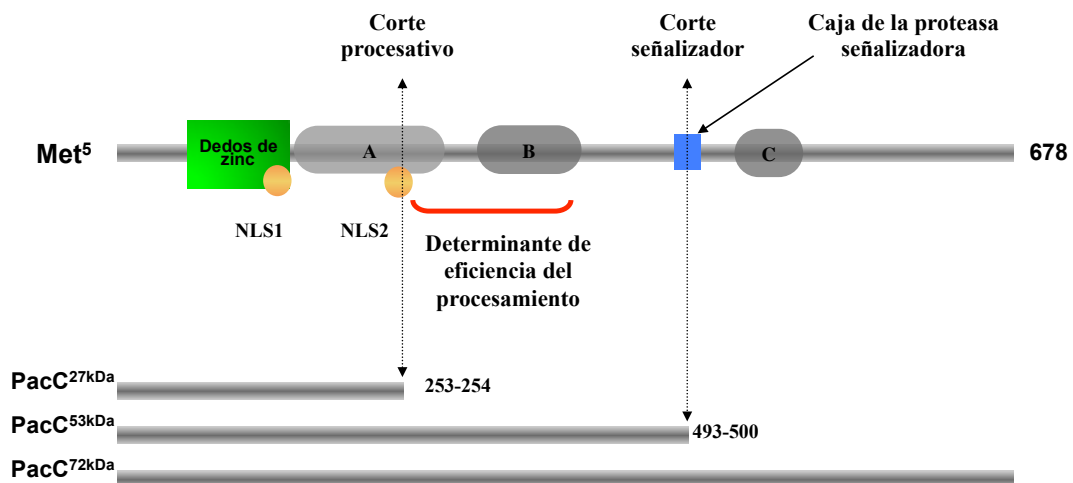
PacC<sup>53</sup> es accesible a la proteasa procesativa, responsable del segundo corte proteolítico, que, de manera independiente de pH y de la ruta *pal*, da lugar a PacC<sup>27</sup>. Este segundo corte se produce a la altura de los residuos 252-254 por lo que PacC<sup>27</sup> está constituida por los primeros 250 aminoácidos del factor de transcripción. Para que se produzca el corte, la proteasa procesativa no requiere una secuencia específica, su actividad parece estar determinada por factores estructurales o de secuencia alejados de la zona de corte, dando lugar, además, a productos de tamaño ligeramente variable<sup>28,32</sup>. Las características del corte procesativo apuntan al proteosoma

como el principal candidato a ser la proteasa procesativa de PacC<sup>33,34</sup>. PacC<sup>27</sup> activa la transcripción de los genes alcalinos y reprime la de los genes ácidos. Esta regulación la ejerce uniéndose a sus dianas en el promotor de los genes correspondientes<sup>13,18,32,35,36</sup>.

Finalmente, las interacciones intramoleculares que mantienen PacC en su forma inactiva también pueden ser eliminadas mediante la sustitución de ciertos residuos, como por ejemplo la sustitución del residuo Leucina 340 por Serina que genera una forma abierta de PacC<sup>72</sup> accesible a la proteasa procesativa (Figura 3).

**1.2.1.1.2. El procesamiento de PacC regula su localización subcelular.**

El control de la localización subcelular de los factores de transcripción en los organismos eucariotas constituye un importante nivel de regulación. El factor de transcripción PacC debe acceder al interior nuclear para poder desempeñar su función. En ausencia de señal de pH alcalino, el procesamiento de PacC está bloqueado y, aunque una fracción de la proteína está confinada en el núcleo, PacC<sup>72</sup> se localiza principalmente en el citoplasma<sup>31</sup>. En respuesta a la alcalinización del medio, y como consecuencia de la activación de la ruta de transducción de la señal de pH, la localización de PacC cambia ya que el procesamiento proteolítico promueve su importe nuclear, de modo que, tanto PacC<sup>53</sup> como PacC<sup>27</sup> se localizan preferentemente en el núcleo<sup>31</sup>. PacC contiene, al menos, dos señales potenciales de localización nuclear (NLS) de diferente naturaleza e independientes entre sí, que se llaman NLS1 y NLS2 (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de PacC.** Se muestran los tres dominios de interacción intramolecular A, B y C en gris, los dedos de zinc en verde, la caja de la proteasa señalizadora en azul, y en anaranjado ambas NLSs. Los dos sitios de corte proteolítico, así como las formas procesadas obtenidas están indicadas.

La NLS1 es una NLS monopartita clásica, con actividad constitutiva, situada en la hélice  $\alpha$  del tercer dedo de zinc de PacC. Está compuesta por residuos básicos, algunos de ellos implicados en la interacción con el ADN. Se ha demostrado que NLS1 media el transporte nuclear activo de la proteína y que para ser funcional requiere el correcto plegamiento del dominio de unión a ADN<sup>31,35</sup>. La NLS2 es una NLS bipartita funcional dependiente de señalización que está situada entre los residuos 252 y 269 de PacC. PacC<sup>53</sup> es la única forma de PacC capaz de interactuar *in vitro* con la importina  $\alpha$ /KapA (un interactivo de las NLSs de tipo bipartito)<sup>37</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Esta interacción depende de la presencia de los residuos Lys253 y Lys267 localizados en la NLS2 de PacC por lo que estos residuos son esenciales para la función de la proteína.

### 1.2.1.2. Los genes *pal*: componentes de la ruta de transducción de la señal de pH ambiental.

La ruta de transducción de la señal de pH está compuesta por, al menos, seis proteínas: PalA, PalB, PalC, PalF, PalH y PalI. Se han encontrado homólogos para todos los genes *pal* en genomas de hongos filamentosos y levaduriformes<sup>7,38</sup>.

PalH y PalI son 2 proteínas con dominios transmembrana (TM), lo que sugiere que puedan localizarse en la membrana plasmática ejerciendo como posibles sensores de la señal de pH ambiental<sup>20,21,39</sup>. PalH es una proteína de 760 residuos, con 7 hélices transmembrana y una cola C-terminal citoplásmica de 409 residuos<sup>20</sup>. PalI es una proteína de 601 residuos, con 3 hélices transmembrana seguidos de una cola C-terminal hidrofílica de 375 residuos, presumiblemente citosólica<sup>21,39</sup>.

PalA es una proteína de 798 residuos con un dominio Bro1 en la parte N-terminal<sup>24</sup>. PalA une dos motivos YPXL/I en la parte C-terminal de PacC, a ambos lados del sitio de corte de la proteasa señalizadora<sup>40</sup>. Al inicio de este estudio se demostró que PalA también interacciona en el sistema de doble-híbrido con Vps32, una proteína perteneciente al complejo multiproteico ESCRT-III (“Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III”)<sup>40</sup>.

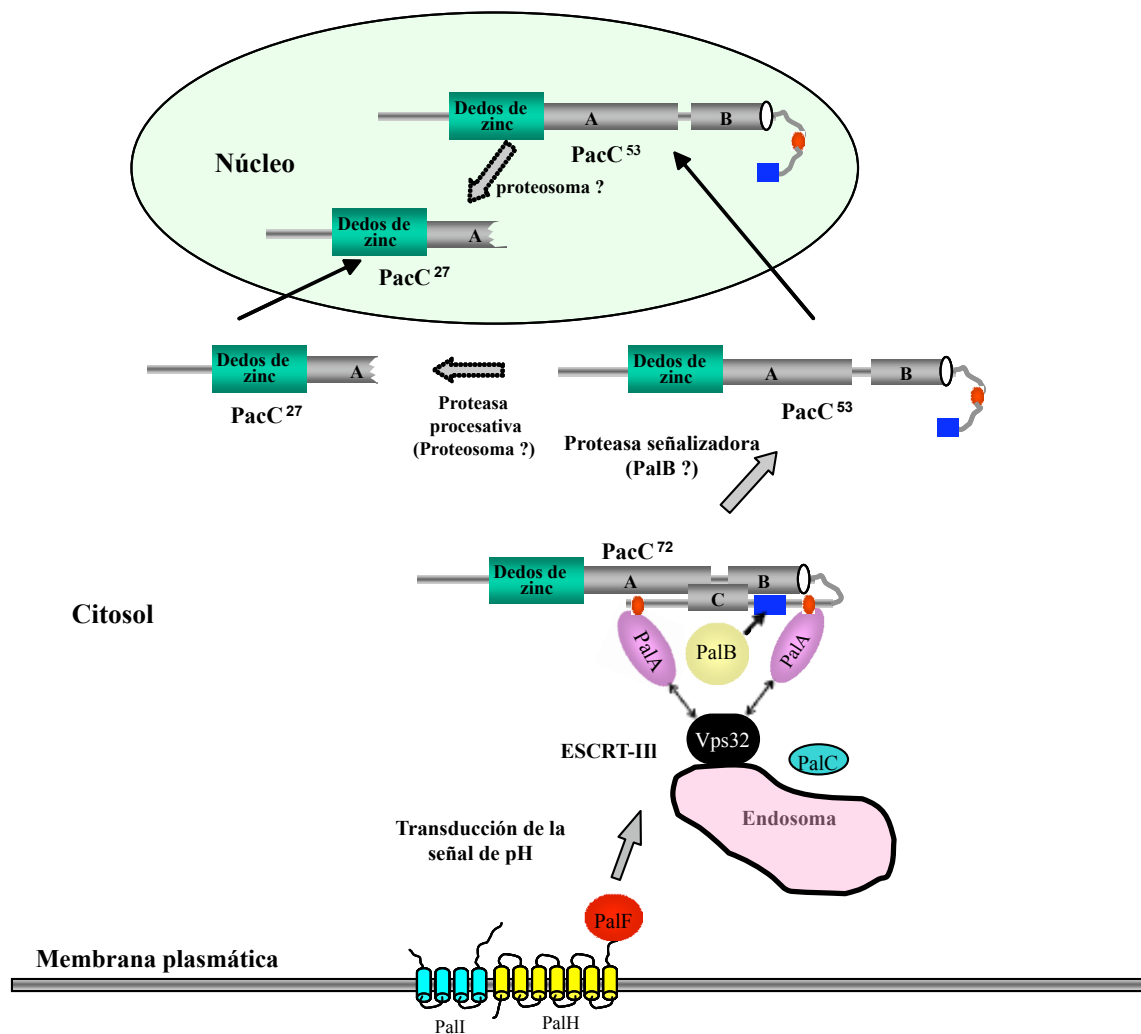
PalB es una cisteín proteasa con un dominio catalítico característico de las calpaínas (cisteín proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ )<sup>22</sup>. Aunque conserva el dominio catalítico característico de dichas proteasas, Cys-His-Asn, PalB carece de los dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (“EF-hands”) propios de las calpaínas<sup>41,42</sup>. Junto al dominio catalítico de PalB se encuentra una región altamente conservada denominada dominio PBH (“PalB Homology Domain”), presente también en otras proteínas homólogas a PalB como PalBH/Calpaína7 (en humanos y ratón) o Tra-3 (en *Carnobditiis elegans*)<sup>42,43</sup>. El hecho de que el dominio PBH esté conservado en proteínas de organismos alejados evolutivamente sugiere que dicho dominio podría estar relacionado con la especificidad de sustrato<sup>44</sup>. PalB se requiere para el corte señalizador pero no para el procesativo, por lo que es el principal candidato a ser la proteasa señalizadora de PacC<sup>30</sup>.

PalC es una proteína de 507 residuos para la cual no se habían identificado dominios de función conocida al inicio del estudio<sup>20</sup>.

PalF es una proteína de 775 residuos<sup>23</sup>. El análisis detallado de la secuencia proteica de PalF y de sus homólogos nos permitió, al inicio de este estudio, detectar la existencia de bloques de secuencia conservados presentes en proteínas no caracterizadas en este momento, identificadas en los programas de secuenciación de distintos genomas de metazoos, incluyendo el genoma humano. Estas proteínas de metazoos presentan una clara similitud en secuencia de aminoácidos con proteínas de la familia de las arrestinas, y los bloques de conservación de secuencia entre PalF y sus homólogos tanto en hongos como en metazoos corresponden a los principales motivos estructurales de las arrestinas identificados por cristalografía. El análisis por doble-híbrido de las posibles interacciones entre los productos de los distintos genes *pal* llevó a la detección de una fuerte interacción entre PalF y la cola citoplásmica C-terminal de la proteína 7TM PalH. Este resultado, junto con el hecho de que una de las características principales de las arrestinas de mamíferos es su capacidad de interaccionar con receptores 7TM, indica que PalF está funcionalmente relacionada con ésta familia de proteínas.

### 1.2.2. Modelo molecular de regulación de la expresión génica en respuesta al pH ambiental.

El conjunto de los datos recogidos durante el estudio de la regulación por pH ambiental en *A. nidulans* permitió proponer un modelo molecular de funcionamiento para esta vía de señalización<sup>25,33,45</sup>. Este modelo se utilizó como punto de partida para iniciar nuestro estudio. El modelo recogido en la Figura 5 describe cómo en una situación de crecimiento de *A. nidulans* en un medio a pH ácido, el producto primario de traducción de PacC, PacC<sup>72</sup>, se localiza en el citoplasma, en una conformación inactiva. Esta conformación se debe a las interacciones intramoleculares entre las regiones A, B y C del factor de transcripción, haciéndolo inaccesible a la acción de la proteasa procesativa, e inactivando la NLS presente en los dedos de zinc. En estas circunstancias concurre la ausencia de represión de los genes “ácidos” y la no-activación de los genes “alcalinos”.



**Figura 5. Modelo de la ruta de señalización por pH ambiental.** Ver descripción en el texto.

Un incremento del pH ambiental, detectado por el putativo sensor de pH en la membrana plasmática, PalH, asistido por PalI, transmitiría la señal de pH a PalF, quien interacciona con un dominio citoplásmico de PalH. Dado que PalA interacciona con PacC y con Vps32, un componente del complejo multiproteico ESCRT-III asociado a la membrana del endosoma, es posible que la señal de pH favorezca la internalización del complejo sensor por endocitosis y su interacción con ESCRT. Este suceso daría lugar a la formación de un

## INTRODUCCIÓN

complejo en el cual participarían Vps32, PalA, PalB y PacC. La formación de este complejo permitiría el corte proteolítico de PacC por parte de la proteasa señalizadora, probablemente PalB, para dar lugar a la forma PacC<sup>53</sup> que podría translocarse al núcleo. La forma PacC<sup>27</sup>, que se genera a partir de PacC<sup>53</sup>, muestra también localización nuclear, donde se uniría a sus dianas en los promotores y actuaría reprimiendo la expresión de los genes “ácidos” y activando la de los genes “alcalinos”. No hay evidencias que sustenten una localización subcelular concreta para la acción de la proteasa procesativa, que podría estar actuando en el citoplasma, en el núcleo o en ambos compartimentos.

### 1.2.3. La ruta de señalización por pH ambiental en otros hongos.

Se han identificado homólogos de PacC en muchos ascomicetos filamentosos, incluyendo *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium chrysogenum*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Aspergillus oryzae*<sup>27,46-49</sup>. También se han identificado homólogos para todos los genes implicados en la ruta de pH en ascomicetos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* y *Neurospora crassa* o en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida albicans*.

El estudio más exhaustivo de la ruta de señalización por pH ambiental en levaduras ha sido llevado a cabo en *S. cerevisiae*. En esta levadura, se han realizado varios estudios a gran escala para analizar la expresión de genes en función del pH ambiental. Se han encontrado entre 71 y 500 genes cuya expresión varía en función del pH externo<sup>50-52</sup>. Los genes identificados codifican para proteínas implicadas en diversas rutas metabólicas y biosintéticas, reguladores transcripcionales, proteínas transportadoras, reguladores de homeostasis, proteínas implicadas en endocitosis y secreción, etc...

En levaduras, los genes implicados en la ruta de señalización por pH ambiental se llaman *RIM*. Su nombre proviene de "Regulador de *IME2*", un gen implicado en el proceso de esporulación meiótica en *S. cerevisiae*. La ruta *RIM*, por otra parte, regula el crecimiento invasivo en *S. cerevisiae*<sup>53</sup>. El ortólogo de PacC es la proteína Rim101, que contiene 3 dedos de zinc de tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> esenciales para su función<sup>54</sup>. Aunque el tamaño de PacC y Rim101 sea similar, las zonas de homología están restringidas a la región de los dedos de zinc.

Se han encontrado homólogos de todos los genes *pal* en *S. cerevisiae*. Rim20 es el homólogo de PalA y, al igual que PalA y PacC, Rim20 y Rim101 interaccionan entre sí<sup>55</sup>. Rim21 y Dfg16 son los homólogos de PalH en *S. cerevisiae*<sup>56,57</sup>. Ambas proteínas contienen siete hélices transmembrana y una larga cola citoplásmica y son potenciales sensores del pH ambiental, pudiendo actuar como un heterodímero<sup>57</sup>. Rim9 es el homólogo de PalI y también tiene 3 hélices transmembrana. Sin embargo, mientras que PalI contiene 549 residuos, Rim9 contiene solo 239 residuos ya que carece de la cola C-terminal citoplásmica de 370 residuos presente en PalI<sup>21</sup>. Rim13 es el homólogo de la cisteína proteasa PalB, se nombró en un principio Cpl1 por su homología de secuencia con las calpaínas<sup>41,58</sup>. Finalmente, Rim8/Pal3 es el homólogo de PalF<sup>56</sup>, ambas proteínas están relacionadas con las arrestinas de mamífero. Aunque no se identificaron inicialmente homólogos para PalC<sup>20</sup>, se identificó posteriormente una proteína candidata a ser el homólogo de PalC en *S. cerevisiae*, Ygr122w<sup>38</sup>.

En *S. cerevisiae*, Rim101 está implicado en la regulación por pH ambiental y, a diferencia de PacC, se activa mediante un único paso de procesamiento proteolítico en el que se eliminan alrededor de 100 residuos de la región C-terminal de Rim101<sup>53,55</sup>. Este corte proteolítico es equivalente al primer corte señalizador en PacC<sup>28,55</sup> y depende de la integridad de la ruta *RIM* y del pH ambiental. El candidato para llevar a cabo este procesamiento del factor de transcripción es el homólogo de PalB, Rim13<sup>28,55</sup>. Las mutaciones que producen un

truncamiento del factor de transcripción después de los residuos 485, 531, o 539, son epistáticas sobre mutaciones que inactivan *RIM9*. Estas mutaciones dan lugar a una proteína Rim101 activa de forma constitutiva<sup>53</sup>. Estos resultados son consistentes con el modelo de regulación propuesto para PacC, donde la conformación inactiva del factor de transcripción se debe a interacciones intramoleculares entre dominios internos de la proteína y su región C-terminal.

En *S. cerevisiae*, la forma procesada de Rim101 reprime la transcripción de *RIM8* en condiciones de neutralidad o alcalinidad. Se ha sugerido que este mecanismo podría evitar la acumulación de Rim101 procesado mediante la regulación de la actividad de la proteasa Rim13<sup>59</sup>. A diferencia de PacC que puede actuar como represor ó activador transcripcional, Rim101 actúa positivamente de forma indirecta reprimiendo la expresión de *NRG1* y *SMP1*, que codifican represores transcripcionales<sup>59</sup>. Esta represión se lleva a cabo mediante la unión de Rim101 a la secuencia TGCCAAG en el promotor de estos genes.

La ruta *RIM* ha sido también estudiada en otras levaduras como por ejemplo *Candida albicans*. *C. albicans* es un hongo patógeno oportunista y es la cuarta causa de infección nosocomial en el mundo<sup>60</sup>. Es un hongo dimórfico, en condiciones de 37° C de temperatura y pH cercano a la neutralidad se favorece la forma filamentosa mientras que a pH 4 predomina la forma levaduriforme. Esta característica es esencial para la patogénesis del hongo ya que su virulencia viene determinada por su crecimiento como hongo filamentoso. La ruta de señalización por pH ambiental mediada por CaRim101(Ppr2) está conservada en *C. albicans* y su función principal es controlar esta transición dimórfica. Esta ruta regula parcialmente la respuesta transcripcional a la alcalinización del medio y activa, entre otros, la expresión de los genes *PHR1* y *PRA1*, y reprime la expresión de *PHR2*<sup>61-63</sup>. *C. albicans* es capaz de responder a cambios de pH ambiental en ausencia de CaRim101, ya que parte de la respuesta transcripcional a pH alcalino es independiente de este factor de transcripción. Esto sugiere que existe otra vía alternativa de señalización<sup>63</sup>. Se ha identificado un gen, *MDS3*, que actúa en una vía paralela a la mediada por CaRim101. *MDS3* y *CaRIM101* son necesarios para el sistema de regulación por pH y ambos se requieren para la expresión de genes implicados en filamentación.

#### **1.2.4 Similitudes entre la ruta de señalización por el pH ambiental en hongos y la ruta Hedgehog en metazoos.**

La ruta de señalización por pH ambiental en hongos posee similitudes con el sistema de respuesta al morfógeno Hedgehog/Sonic-Hedgehog mediado por los factores de transcripción de la familia Ci/Gli en metazoos.

Los péptidos de la familia Hedgehog (Hh) de la mosca *Drosophilla melanogaster*, y su homólogo en vertebrados Sonic Hedgehog (Shh), son los morfógenos más estudiados en metazoos ya que participan en importantes procesos como el desarrollo de apéndices, la formación del tubo neural, el mantenimiento de células madre y el desarrollo de tumores<sup>64-66</sup>. Los efectores finales de la ruta de señalización de Hh son los factores de transcripción de la familia Cubitus interruptus (Ci)/Gli. Estos factores de transcripción contienen un dominio N-terminal de unión al ADN altamente conservado, formado por cinco dedos de zinc de tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub><sup>67</sup>, en el que solapa una NLS bipartita<sup>68</sup>. En el resto de la proteína existen varias regiones de interacción con otros componentes de la ruta y dos putativas señales de exportación nuclear (NES).

El procesamiento proteolítico y la localización subcelular de las distintas formas de Ci/Gli media la regulación de la expresión génica en respuesta a la presencia o ausencia de Hh/Shh. En *D. melanogaster*, en

## INTRODUCCIÓN

ausencia de Hh, la proteína de membrana Patched (Ptc) suprime la actividad de la proteína 7TM Smoothened (Smo). El producto primario de traducción del gen *cubitus interruptus*, Ci<sup>155</sup>, es procesado proteolíticamente para dar lugar a la forma Ci<sup>75</sup> (de 75 kDa). La forma Ci<sup>75</sup> migra al núcleo para actuar como represor transcripcional de genes como *dpp* o *ptc* <sup>69</sup>.

La presencia de Hh y su unión a Ptc en la membrana citoplasmática produce la inactivación de esta proteína. Como consecuencia, Smo se activa <sup>70</sup>, lo que lleva, mediante una serie de procesos, al bloqueo de la proteólisis de Ci<sup>155</sup>. Ci<sup>155</sup> es una forma hiperactiva del factor de transcripción que migra al núcleo, donde actúa como activador transcripcional <sup>71</sup>.

Existen muchas similitudes entre la vía regulada por Ci/Gli y la regulada por PacC. Ambas rutas de transducción de señal comparten la presencia de un receptor con siete hélices transmembrana y una larga cola citoplasmática (Smoothened y PalH). Además, PalF esta relacionada con las arrestinas de mamíferos y la ruta hedgehog esta también mediada por una proteína de esta familia, la beta-arrestina 2 <sup>72,73</sup>. En ambos casos, existe una clara relación con la maquinaria de endocitosis: en el caso de Ci/Gli, por la implicación del tráfico de vesículas del endosoma tardío en la regulación ejercida por Ptc sobre Smo <sup>70</sup>, y en el caso de PacC, por la interacción de PalA con un componente de la maquinaria ESCRT asociada al endosoma <sup>40</sup>. Respecto al factor de transcripción, ambos tienen dominios de unión al ADN formados por el mismo tipo de dedos de zinc (tipo Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>) y presentan un grado de similitud de secuencia elevado, sobre todo en el último dedo de zinc, en el que además solapan la actividad de interacción con el ADN y la actividad como NLS <sup>35,37,68</sup>. Ambos factores de transcripción son procesados proteolíticamente de forma dependiente de señal. En el caso de Ci, se ha comprobado que este procesamiento lo lleva a cabo el proteosoma y que la presencia del dominio rígido y estable de los dedos de zinc, seguido de una zona sin estructura aparente y de baja complejidad de aproximadamente 100 aminoácidos, constituye la señal que permite la degradación parcial del factor de transcripción por el proteosoma <sup>74</sup>. Esta situación podría ser similar en el caso de PacC <sup>34,37</sup>.

Por lo tanto, las similitudes, tanto a nivel de componentes, como a nivel funcional, de las rutas de transducción de señal controladas por Ci/Gli y PacC, hacen lógico pensar en la existencia de un origen ancestral común para estas vías de señalización de metazoos y hongos.

### 1.3.- LA MAQUINARIA ENDOCÍTICA ESCRT

El estudio de la ruta de señalización por pH ambiental en hongos ha demostrado la existencia de una conexión entre esta vía y la maquinaria ESCRT (“Endosomal Sorting Complex Required for Transport”) asociada a la membrana del endosoma e implicada en la formación del cuerpo multivesicular. El cuerpo multivesicular fue descrito hace más de 50 años gracias a estudios de microscopía electrónica. Este compartimento está formado por membranas que encierran múltiples vesículas internas de entre 40-90nm <sup>75</sup>. Los endosomas comprenden un sistema heterogéneo de compartimentos en los que se encuentran los endosomas tempranos y los endosomas tardíos, que se pueden distinguir por su morfología y localización. Así, los endosomas tempranos son tubulares y se localizan cerca de la membrana celular ó hacia la periferia celular, mientras que los endosomas tardíos son esféricos y están más cerca del núcleo <sup>76,77</sup>. Los cuerpos multivesiculares, ó MVBs, son una subclase de endosomas que han sufrido una maduración. Se designan así porque contienen vesículas internas que han gemado hacia el interior del endosoma <sup>78</sup>. El compartimento endosomal recibe el tráfico de vesículas procedentes tanto del Golgi como de la membrana plasmática.



La ruta endocítica juega un papel principal en la interacción de las células con el exterior ya que se encarga de internalizar fluidos y partículas extracelulares permitiendo así la entrada de nutrientes. Es crucial también para la regulación de la composición de la membrana plasmática, promoviendo la degradación vía lisosoma/vacuola de los receptores ó su reciclamiento a la membrana. Además, la ruta de los MVBs tiene otras funciones a parte de la degradativa. Muchas hidrolasas vacuolares/lisosomales llegan a su destino a través de esta ruta. Así mismo, virus como el VIH utilizan la maquinaria del MVB para gemar al exterior desde las células <sup>79</sup>. Defectos en la maquinaria del MVB tienen efectos en la transducción de señales y en el control del crecimiento celular.

Las proteínas de membrana destinadas a ser degradadas, son internalizadas mediante la invaginación y formación de vesículas en el MVB. Cuando la membrana del MVB se fusiona con el lisosoma/vacuola, las vesículas y las proteínas cargo contenidas en ellas se “vierten” al lumen vacuolar donde serán degradadas por enzimas hidrolíticas. Las proteínas excluidas de las vesículas internas del MVB pueden permanecer en la membrana de modo que, cuando la fusión se produce, pasan a formar parte de la membrana del lisosoma/vacuola <sup>80</sup>. Se han identificado en la levadura más de 70 genes *VPS* (de “Vacuolar Protein Sorting”) necesarios para el transporte de proteínas a la vacuola <sup>81</sup>. Estos genes han sido agrupados en 6 clases (A-F) dependiendo de la morfología del mutante correspondiente. Las proteínas implicadas en la ruta del MVB están codificadas por los genes *VPS* de clase E (revisado en <sup>82</sup>).

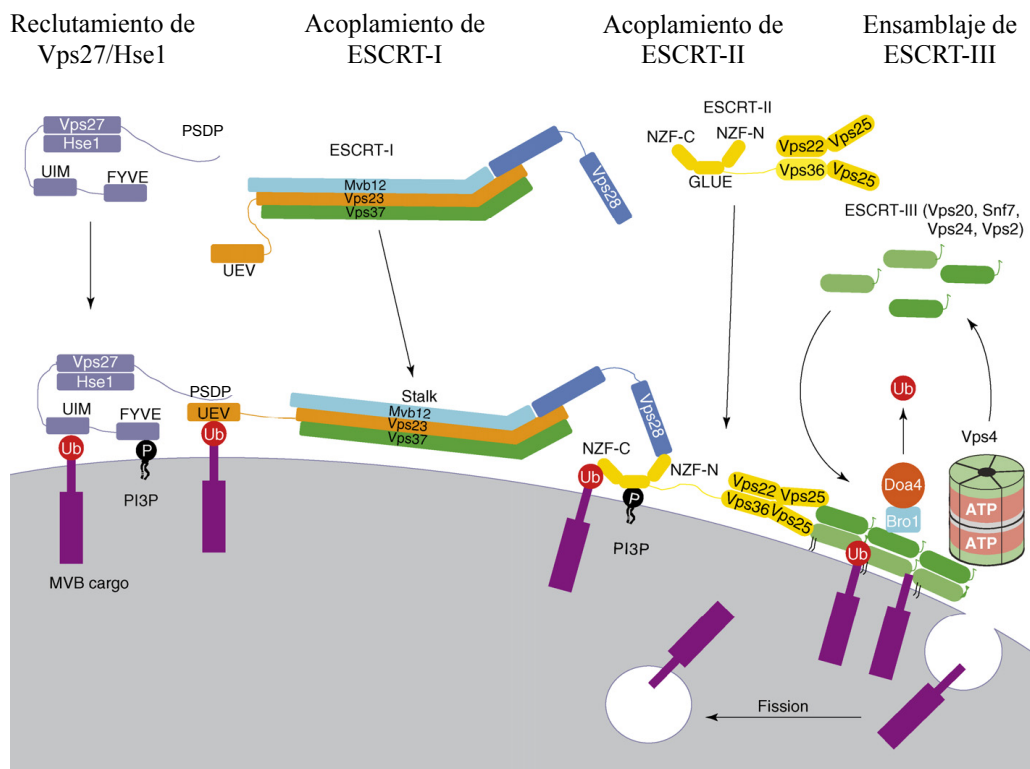
### 1.3.1. Proteínas Vps de clase E.

Se conocen al menos 18 proteínas Vps de clase E en levadura, de las cuales 10 son componentes conocidos de los complejos ESCRT <sup>78,82,83</sup>. Estos complejos multiproteicos se encargan de reconocer y concentrar el cargo, además de formar la vesícula en el lumen del endosoma <sup>78</sup>. Cada proteína Vps tiene uno ó varios ortólogos humanos, por lo cual la vía de formación de los MVBs en levadura sirve como modelo de estudio para esta ruta en humanos <sup>84</sup>. La delección de cualquiera de los genes implicados provoca la acumulación de un endosoma aberrante llamado “compartimento de clase E”.

Las proteínas de membrana destinadas a ser degradadas en el lisosoma/vacuola se señalizan con una molécula de ubiquitina (monoubiquitinación ó multiubiquitinación si son varios residuos lisina) a diferencia de las proteínas destinadas a ser degradadas por el proteasoma, que son poliubiquitinadas con cadenas conectadas en Lys48. Recientemente, ha sido demostrado que la poliubiquitinación con cadenas conectadas en Lys63 pueden también ser una alternativa a la monoubiquitinación como señal para que la ruta de los MVBs “clasifique” eficientemente la proteína marcada <sup>75,84,85</sup>.

Los complejos mutiproteicos ESCRT son reclutados secuencialmente a la membrana del endosoma (Figura 6). El reclutamiento se produce a través de las proteínas adaptadoras Vps27 y Hse1 que interaccionan con el cargo ubiquitinado. El complejo formado por Vps27 y Hse1, denominado ESCRT-0, recluta el complejo ESCRT-I que a su vez recluta ESCRT-II, lo que permite el ensamblaje de ESCRT-III en la superficie de la membrana del endosoma. La maquinaria ESCRT está implicada en la selección del cargo y en la formación de las vesículas del MVB <sup>78,82</sup>.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 6. Modelo de acoplamiento a la membrana de los complejos ESCRT.** El dominio FYVE de Vps27 une PI(3)P en la membrana del endosoma permitiendo el acoplamiento del complejo Vps27–Hse1. Los dominios UIM de Vps27 y Hse1 reconocen y unen el cargo ubiquitinado para dirigirlo a las vesículas del MVB. El complejo Vps27–Hse1 recluta ESCRT-I a la membrana mediante interacciones con el dominio UEV de Vps23. ESCRT-I unido a la membrana une el cargo ubiquitinado a través del dominio UEV de Vps23 y recluta ESCRT-II a la membrana mediante interacciones entre el dominio C-terminal y NZF-N de Vps28 y Vps36 respectivamente. El dominio GLUE de Vps36 une PI(3)P, mientras que el dominio NZF-C une el cargo ubiquitinado. ESCRT-II permite el ensamblaje del complejo ESCRT-III a través de las interacciones entre Vps25 y Vps20. ESCRT-III es desensamblado por la ATPasa Vps4. Modificado de <sup>86</sup>.

Vps27, cuyo homólogo en mamíferos es Hrs, contiene dos motivos de interacción con ubiquitina (UIM), a través de los cuales interacciona con el cargo ubiquitinado. Por otra parte, el dominio FYVE de Vps27 interacciona con el fosfatidil-inositol-3-fosfato (PI(3)P) que confiere identidad a la membrana del endosoma <sup>75</sup>. A su vez, los motivos peptídicos PSDP de Vps27 reclutan el complejo ESCRT-I a la membrana interaccionando con el dominio UEV de Vps23 <sup>87,88</sup>. Vps27 también recluta la clatrina formando una capa que retiene los cargos ubiquitinados y evita que sean reciclados a la membrana plasmática <sup>78</sup>. Vps27 forma un complejo con la proteína Hse1 (cuyo homólogo en mamíferos es Stam) que también contiene motivos UIM y parece estar implicada en el reclutamiento de ubiquitina ligasas y enzimas deubiquitinadoras (DUB) <sup>89</sup>.

ESCRT-I es un complejo de 350kDa compuesto por 4 proteínas, Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12 <sup>83,90</sup>. Vps23 se une a la ubiquitina del receptor a través de su dominio N-terminal UEV, además de unir los motivos PSDP de Vps27 <sup>87,88</sup>. Una secuencia peptídica parecida (P(S/T)AP) se ha encontrado en las proteínas Gag de muchos retrovirus (HIV-1, HTLV-1 etc...) que utilizan este motivo para secuestrar la maquinaria ESCRT con el fin de formar vesículas víricas en la membrana plasmática y así escapar de las células infectadas <sup>79</sup>.

Vps28, a través de su dominio C-terminal (CTD) formado por 4  $\alpha$ -hélices, recluta ESCRT-II interaccionando con el dedo de zinc de tipo NZF1 (de “Npl4 Zinc Fingers”, revisado en <sup>91</sup>) contenido en el dominio GLUE de Vps36 <sup>92,93</sup>. Mvb12 ha sido la última proteína identificada del complejo ESCRT-I y se ha visto que interacciona con el dominio “coiled coil” de Vps23, estabilizando así el complejo en su forma oligomérica inactiva y soluble <sup>90,94</sup>. Se ha demostrado que ésta proteína no es esencial para la función de ESCRT-I, pero que sí es necesaria para el correcto tráfico del cargo y para la liberación del complejo de la membrana del endosoma <sup>95</sup> ya que la pérdida de función de este componente produce un fenotipo parcial *vps* clase E y provoca la unión prematura de ESCRT-I con ESCRT-II y la formación de un complejo estable en el citosol <sup>94</sup>.

ESCRT-II es un complejo soluble de 155 kDa compuesto por una molécula de Vps22 y Vps36 y dos de Vps25. Vps22 es una pequeña proteína de 30kDa, Vps36 es una proteína de 65kDa que contiene un dominio rico en cisteína (Cys-X-X-Cys) en la región N-terminal, un dominio GLUE que interacciona con los fosfoinosítidos PI(3)P de la membrana del endosoma <sup>96</sup> y dos dominios de dedo de zinc NFZ insertados en el dominio GLUE <sup>91</sup>. El dedo de zinc más N-terminal une ubiquitina y proteínas ubiquitinadas y el más C-terminal interacciona con la subunidad Vps28 del complejo ESCRT-I <sup>96</sup>. Sin embargo en humanos, la unión de Vps36 a ubiquitina no se hace a través de un dominio NZF <sup>97</sup>. Vps25 es una proteína de 25kDa responsable de la asociación con ESCRT-III ya que interacciona físicamente con él a través de Vps20 <sup>98</sup>.

Existen 4 genes que codifican para proteínas del complejo ESCRT-III en levadura: *VPS20*, *SNF7/VPS32*, *VPS2* Y *VPS24* <sup>99</sup>. Todas estas proteínas son pequeñas, de unos 20-25kDa, altamente cargadas, con extremos N-terminal básicos y C-terminal ácidos y contienen uno o dos dominios “coiled coil”. Las proteínas inactivas son monómeros y se localizan en el citosol de donde son reclutadas en la cara citoplásmica del endosoma para ensamblarse dando lugar al complejo ESCRT-III <sup>99</sup>. La reconstitución del ensamblaje de ESCRT-III indica que este proceso está iniciado por la unión de Vps20 a la membrana del endosoma <sup>100</sup>. Vps20 interacciona con Vps25 del complejo ESCRT-II. La unión de Vps25 cambia la conformación de Vps20, lo que permite su interacción con Snf7. Este proceso da lugar a un cambio de conformación en Snf7, lo que permite su oligomerización en un filamento. El filamento formado por Snf7 se termina mediante el reclutamiento de Vps24 quien forma un complejo con Vps2, necesario para que pueda reclutarse la AAA-ATPasa Vps4.

Recientemente, la reconstitución *in vitro* de la biogénesis de los MVBs ha permitido atribuir una función a cada uno de los complejos ESCRT <sup>101</sup>. ESCRT-0 es responsable de la concentración del cargo ubiquitinado en la membrana del endosoma mientras que ESCRT-I y ESCRT-II son responsables de la formación de la vesícula en la membrana del endosoma, en la cual los cargos ubiquitinados están dirigidos. Finalmente, el filamento formado por ESCRT-III permite la separación de la vesícula de la membrana del endosoma y su liberación con el cargo ubiquitinado en el lumen del endosoma.

Se ha comprobado que antes de ser internalizado en el lumen del endosoma, el cargo es deubiquitinado por la deubiquitinasa Doa4 en levadura. La proteína encargada de reclutar Doa4 a la membrana del endosoma es Bro1 (homólogo en mamíferos: Alix), una proteína Vps de clase E soluble y citoplásmica que también interacciona con Snf7 del complejo ESCRT-III <sup>102,103</sup>. Bro1 contiene un dominio conservado (denominado dominio Bro1) en su región N-terminal.

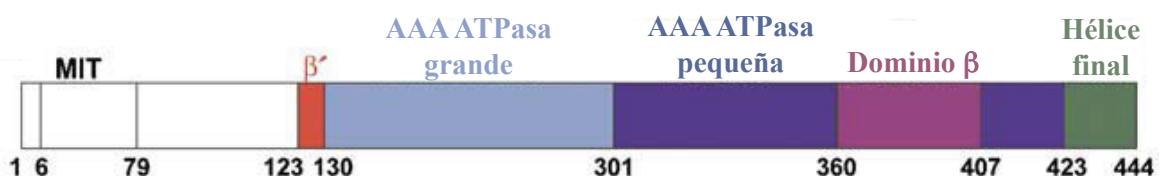
Rim20, un componente de la ruta de señalización por el pH ambiental en *S. cerevisiae*, también contiene un dominio Bro1, y al igual que Bro1, interacciona con Snf7 del complejo ESCRT-III <sup>104</sup>. Antes de iniciar este

## INTRODUCCIÓN

trabajo, nuestro laboratorio demostró mediante ensayos de doble-híbrido que PalA, el homólogo de Rim20 en *A. nidulans*, también interacciona con el homólogo de Snf7 (Vps32) en este organismo <sup>40</sup>. PalA interacciona también con el motivo YPXL en PacC, y esta interacción está conservada en mamíferos ya que la proteína con dominio Bro1, Alix, interacciona con Vps32 y el motivo YPXL <sup>40</sup>. Se ha demostrado que un motivo de tipo YPXL en la proteína Gag de HIV-1 y de otros retrovirus media la interacción con Alix <sup>105,106</sup>. Por otra parte, Alix contiene una región C-terminal rica en Prolina que interacciona con la subunidad Tsg101 del complejo ESCRT-I <sup>106</sup>. Todos estos resultados sugieren que proteínas con dominios Bro1 pueden actuar como adaptadores entre proteínas que contienen el motivo YPXL, como PacC, y el complejo ESCRT-III <sup>40</sup>. Las proteínas con dominio Bro1 han sido identificadas y caracterizadas en numerosos organismos. En *Entamoeba histolítica*, la adhesina con dominio Bro1, EhADH112, forma un complejo con otra proteína, una cisteína proteasa de la familia de las catepsinas <sup>107,108</sup>. Este resultado, junto con el hecho de que PalA está asociado funcionalmente a la cisteína proteasa PalB en la ruta de señalización por pH ambiental en *A. nidulans*, sugiere que la función de proteínas con dominio Bro1 podría estar relacionada con procesos de proteólisis.

### 1.3.2. El desensamblaje de los complejos ESCRT requiere de Vps4.

Una vez ensamblado el complejo ESCRT-III en la superficie de la membrana del endosoma, su disociación requiere de la acción de Vps4, una ATPasa de 48kDa, perteneciente a la familia de las AAA-ATPasas (ATPasa Asociada a varias Actividades celulares) <sup>109</sup>. Vps4 cataliza la disociación de los complejos ESCRT pudiendo así reciclarse sus componentes <sup>110</sup>. Vps4 es una proteína monomérica que se localiza en el citoplasma y se ensambla en anillos oligoméricos. En la Figura 7 podemos observar que Vps4 contiene varios dominios, el principal es el dominio central de unión a ATP que consta de 200 a 250 residuos y que media la oligomerización <sup>110</sup>. Esta región denominada “casete AAA” está formada por dos dominios, el AAA grande y el AAA pequeño. El AAA pequeño contiene a su vez un dominio llamado dominio  $\beta'$  que es necesario para su unión con el cofactor Vta1. Vta1 se une al dominio  $\beta'$  del extremo C-terminal de Vps4 a través de la región VSL <sup>111</sup> acelerando la actividad ATPasa de Vps4 y promoviendo el ensamblaje de su forma activa, un doble anillo hexamérico, heptamérico o pentamérico. Otro dominio importante es el dominio MIT (Interacción con Microtúbulos y Tráfico) que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína y está formado por 3  $\alpha$ -hélices. El dominio MIT es necesario para la interacción de Vps4 con las subunidades de ESCRT-III, su reclutamiento al endosoma <sup>110</sup> y la dimerización de la proteína <sup>112</sup>.



**Figura 7. Esquema de la secuencia aminoacídica de Vps4.** Se muestran los distintos dominios de la proteína. Modificado de <sup>113</sup>

En su forma inactiva, Vps4 esta unida a ADP y forma dímeros estables. Sin embargo en su forma activa 5, 6 o 7 de estos dímeros unidos a ATP oligomerizan formando dos anillos pentaméricos (decámero) <sup>110</sup>, hexaméricos (dodecámero) <sup>113</sup> ó heptaméricos (tetradecámero) <sup>114</sup>. Los dominios MIT se posicionan por encima de una gran cámara central creada en uno de los dos anillos asimétricos. Estos dominios MIT podrían hacer que las subunidades de ESCRT-III entrasen al interior de la cámara central de Vps4 <sup>112</sup> y que la hidrólisis del ATP unido liberase las subunidades del complejo <sup>109,110</sup>. La liberación de Bro1 del complejo también requiere de la acción de Vps4.

La sustitución de un residuo de glutámico por uno de glutamina (Vps4<sup>E233Q</sup> en *S. cerevisiae* y Vps4<sup>E235Q</sup> en mamíferos) y de un residuo de lisina por otro de alanina (Vps4<sup>K179A</sup>) en la región conservada de unión de ATP (AAA) de Vps4 bloquean la actividad ATPasa <sup>110</sup>. El primer mutante es capaz de unir ATP pero no puede hidrolizarlo y el segundo mutante es incapaz de unir ATP, bloqueando, en ambos casos, la disociación del complejo ESCRT-III y en consecuencia la ruta endocítica. La sobreexpresión de la proteína mutada actúa como dominante negativo y produce un efecto similar al observado en un mutante que carece de la proteína.

#### 1.4. LAS ARRESTINAS: REGULADORES DE RUTAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

La relación entre la maquinaria ESCRT y la ruta de señalización por pH ambiental no es el único punto de conexión posible entre esta ruta y la vía endocítica. Uno de los componentes de esta ruta, PalF, presenta una homología de secuencia con las arrestinas de mamíferos y, al igual que estas proteínas, interacciona con dominios citoplásmicos de una proteína con 7 hélices transmembrana (7TM), en este caso PalH. Las arrestinas de mamíferos juegan un papel esencial en la regulación de los receptores 7TM asociados a proteína G (GPCRs) y una de sus principales funciones es su capacidad de actuar como adaptadores endocíticos.

En vertebrados, los receptores GPCR son la familia más amplia y variada de receptores de membrana. La estimulación en la superficie celular de GPCRs regula una amplia variedad de procesos biológicos tales como las percepciones sensoriales (dolor, luz, olores, gusto), contracción muscular, secreción endocrina y exocrina, metabolismo, inflamación e inmunidad. Las proteínas heterotriméricas de unión a GTP (proteínas G) son reclutadas por la forma activa del receptor 7TM, permitiendo así la activación de vías de transducción de señales. La fosforilación de los receptores activados por las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) provoca la unión de las arrestinas, que bloquean la capacidad de los receptores de interactuar con proteínas G, conduciendo a su rápida desensibilización. Por otra parte, la unión de las arrestinas promueve por un lado la endocitosis del receptor y su reciclamiento ó degradación y por otro la señalización hacia otras rutas alternativas.

##### 1.4.1. Clasificación:

Aunque los receptores GPCR habían sido identificados en hongos, no se conocían al inicio de este estudio, proteínas de la familia de las arrestinas en estos organismos. Nuestro grupo, mediante el análisis detallado de la secuencia proteica de PalF y sus homólogos en otros hongos, detectó la existencia de bloques de secuencia conservados, también presentes en las arrestinas de mamífero. El descubrimiento de que PalF, al igual que las arrestinas, es capaz de reconocer específicamente dominios citoplásmicos de un receptor 7TM, demostró que proteínas de la familia de las arrestinas existen en hongos.

En vertebrados, las arrestinas forman una familia de cuatro proteínas que regulan la señalización y el tráfico celular de cientos de receptores acoplados a proteínas G. Las arrestinas se pueden clasificar en dos

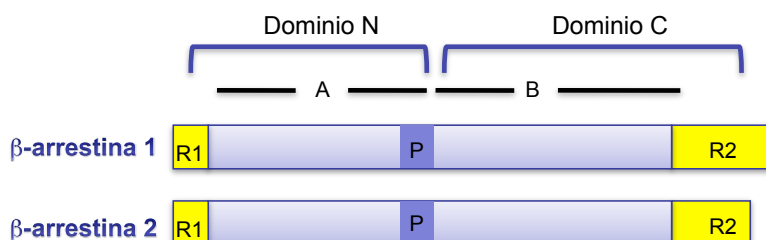
## INTRODUCCIÓN

subfamilias: las arrestinas visuales, que se expresan en fotorreceptores, y las arrestinas no visuales, que son ubicuas. El primer grupo (arrestinas visuales) esta formado por dos tipos: la arrestina-1 (llamada también arrestina visual y anteriormente antígeno-S) que regula la rodopsina y se encuentra en los bastones de la retina del ojo, y la arrestina-4 (arrestina del cono ó X-arrestina) que se encuentra en los conos de la retina del ojo y regula las opsinas del color activadas por la luz (revisado en <sup>115</sup>). Dentro del grupo de las arrestinas no visuales se encuentran otros dos tipos: arrestina-2 ( $\beta$ -arrestina-1) y arrestina-3 ( $\beta$ -arrestina-2), que se describirán más en profundidad a continuación (revisado en <sup>116</sup>).

### 1.4.2 Características estructurales.

En vertebrados, las arrestinas están codificadas por genes que contienen entre 14 y 17 exones. Esta estructura multiexónica es muy antigua ya que en procordados encontramos 13 exones, nueve de los cuales corresponden a los de la arrestina-1. Estas proteínas son monoméricas y su tamaño está relativamente bien conservado desde *C. elegans* hasta humanos (de 360 a 470 residuos) (revisado en <sup>116</sup>). Se han resuelto las estructuras cristalinas de tres de las cuatro arrestinas: la arrestina visual bovina <sup>117</sup>, 2 formas truncadas de la beta-arrestina 2 bovina en su estado inactivo citosólico <sup>118</sup> y la arrestina del cono de salamandra <sup>119</sup>.

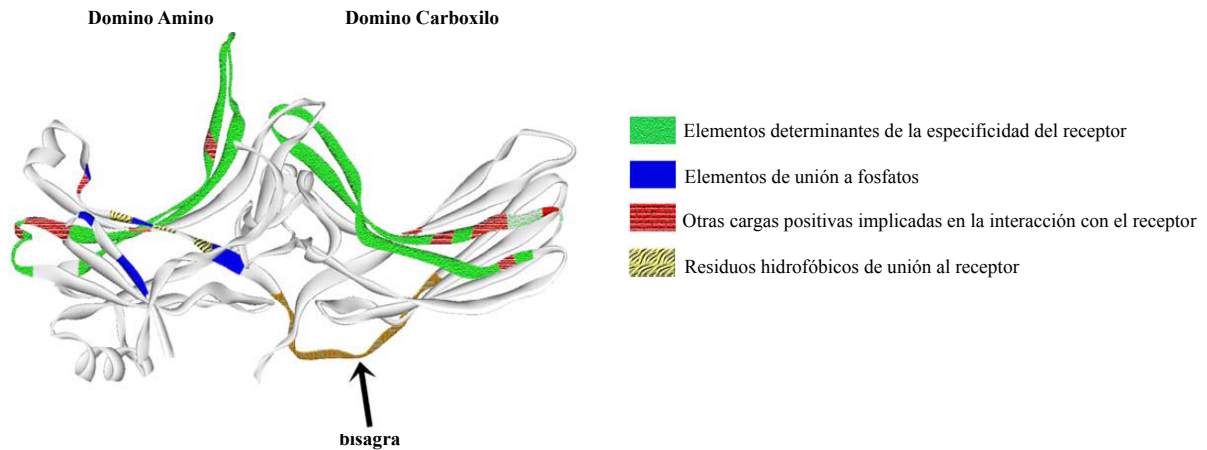
La conformación basal de las  $\beta$ -arrestinas es la de una molécula alargada con dos dominios estructurales, N-terminal y C-terminal. El dominio N-terminal contiene un dominio regulador R1 en el extremo amino y dos dominios funcionales, A (sitio de reconocimiento del receptor activado) y P (dominio sensor de fosfatos). El dominio C-terminal contiene un dominio regulador R2 en el extremo carboxilo y un dominio funcional B (dominio secundario de unión al receptor activado) (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de la estructura proteica de las  $\beta$ -arrestinas.** Se muestran los distintos dominios funcionales. Modificado de <sup>120</sup>

La estructura terciaria de cada dominio es la de un bocado formado por 7 láminas-beta antiparalelas. Los dominios N y C-terminal están unidos entre si por un dominio bisagra que consta de 12 residuos <sup>121</sup>. (Figura 9).

Ambos dominios son unidades de plegamiento independientes ya que se ha visto que son funcionales por separado <sup>122,123</sup>. El dominio N-terminal une preferentemente fosforeceptores activados, aunque con menor afinidad que la molécula entera, mientras que el dominio C-terminal no lo hace. Los dos dominios unen microtúbulos con mayor afinidad incluso que la arrestina entera <sup>124</sup>.

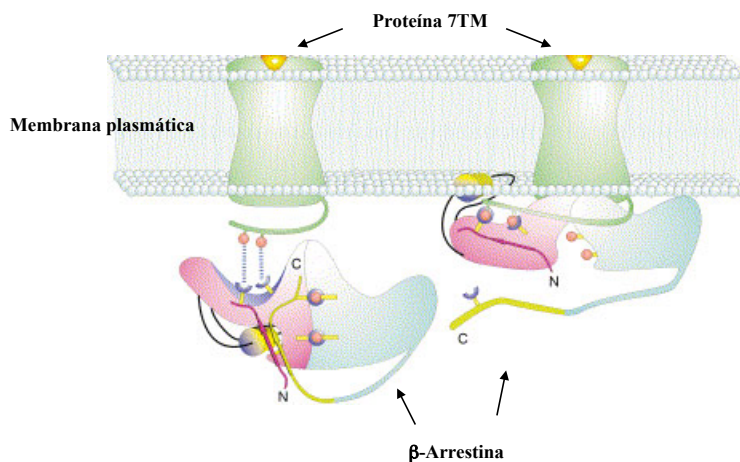


**Figura 9. Diagrama de lazos representando la estructura de la  $\beta$ -arrestina.** Los elementos de unión al receptor están en la zona cóncava de ambos dominios arrestina. Modificado de <sup>129</sup>.

En su forma soluble, la  $\beta$ -arrestina se encuentra inactiva. Los residuos clave que estabilizan la forma soluble inactiva de la molécula están conservados en todas las arrestinas de metazoos. Estos residuos promueven unas interacciones intramoleculares de dos tipos: (Figura 10)

- el núcleo polar, formado por cinco residuos cargados que interaccionan entre si uniendo ambos dominios.<sup>117,118</sup>
- la interacción entre tres elementos que son: el extremo C-terminal, la lámina-beta I y la  $\alpha$ -hélice I.<sup>117,118</sup>

Estudios de mutagénesis dirigida indican que la unión del receptor induce un cambio conformacional en la estructura de las  $\beta$ -arrestinas <sup>121</sup>. Este cambio implica por un lado, la liberación del extremo C-terminal del núcleo polar, lo que permite una mayor accesibilidad de los sitios de unión a clatrina y AP2 <sup>118,125,126</sup>. Por otro lado, el movimiento relativo entre los dominios amino y carboxilo permite la interacción simultánea de ambos con el receptor. Este movimiento está limitado por el tamaño del dominio bisagra (Figura 9) <sup>127</sup>.



**Figura 10. Mecanismo propuesto para la interacción entre  $\beta$ -arrestina y receptor.** Los dominios arrestina N- y C-terminal se muestran en rosa y azul respectivamente. El núcleo polar se localiza en el punto de contacto entre ambos dominios, representado mediante puntos rosas y azules. La conformación inactiva mantiene el núcleo polar intacto en la interfaz de los dos dominios junto al extremo C-terminal. La activación de la  $\beta$ -arrestina-2 al interaccionar con el receptor activado y fosforilado promueve la ruptura del núcleo polar y permite la liberación del extremo C-terminal, exponiendo los motivos de unión a clatrina y AP2. Modificado de <sup>118</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Los elementos de unión al receptor han sido mapeados en la zona cóncava de ambos dominios arrestina y en la cresta prominente en el medio de la molécula, que incluye el lazo protuberante entre las láminas beta V y VI <sup>126,128</sup>. Las  $\beta$ -arrestinas interactúan con un gran número de proteínas como por ejemplo la clatrina, AP2, ARF6, RhoA, componentes de la cascada de MAP quinasas, la fosfodiesterasa PDE4D, c-Src etc... (revisado en <sup>116</sup>). El cambio conformacional entre la  $\beta$ -arrestina soluble y la  $\beta$ -arrestina unida a receptor regula la interacción de las  $\beta$ -arrestinas con estas proteínas <sup>129,130</sup>, aunque se ha visto que varias de ellas, como por ejemplo ARF6, JNK<sub>3</sub> y Mdm2, también interactúan con la  $\beta$ -arrestina libre.

### 1.4.3. Localización

Las  $\beta$ -arrestinas son proteínas ubicuas aunque predominan en los tejidos neuronales y en el bazo, mientras que las arrestinas visuales se expresan en fotoreceptores. Son proteínas solubles y predominantemente citoplasmáticas aunque la distribución subcelular de la  $\beta$ -arrestina-1 puede variar <sup>131,132</sup>. Las  $\beta$ -arrestinas tienen una distribución uniforme en el citosol en condiciones sin estímulo, y se localizan rápidamente en la membrana plasmática en respuesta a la activación del receptor correspondiente <sup>133</sup>. Por otra parte, todas las arrestinas entran en el núcleo y pueden ser exportadas mediante diferentes rutas <sup>131</sup>. La  $\beta$ -arrestina-2 tiene una secuencia de exporte nuclear en el extremo C-terminal pero carece de secuencia de localización nuclear.

### 1.4.4. Función

La primera función descrita de las arrestinas fue su papel en el proceso conocido como “desensibilización de receptores acoplados a proteínas G (GPCR)” (revisado en <sup>116</sup>). La unión del agonista al receptor provoca, mediante una cadena de cambios conformacionales, la activación de éste permitiendo su fosforilación en dominios citoplásmicos por las proteínas quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (revisado en <sup>134</sup>). Las arrestinas se unen a estas regiones citoplásmicas del receptor, desplazando a las proteínas G <sup>129</sup>. De esta forma, las arrestinas apagan o arrestan la señal mediada por las proteínas G.

### Otras funciones de las $\beta$ -arrestinas:

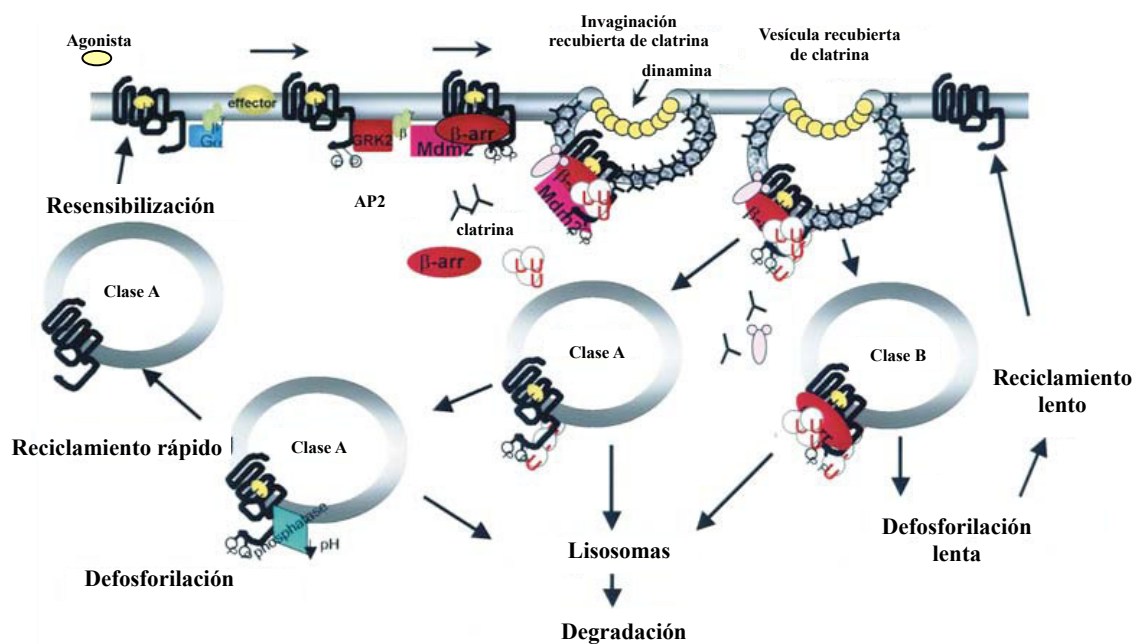
En estos últimos años se ha comprobado que las  $\beta$ -arrestinas llevan a cabo otras funciones en la regulación de los receptores GPCR. Se ha demostrado que estas proteínas interactúan con un gran número de proteínas implicadas en endocitosis y señalización, desempeñando así funciones como la regulación de la endocitosis del receptor y la activación de otras rutas de señalización.

**Endocitosis:** Se ha comprobado que las  $\beta$ -arrestinas dirigen a los receptores hacia vesículas revestidas de clatrina, generalmente, para su internalización mediante endocitosis, eliminándolos así de la membrana plasmática (figura 11). La internalización de los receptores vía endocitosis es necesaria para la defosforilación del receptor y su reciclamiento a la membrana plasmática o su degradación en el lisosoma <sup>135</sup>. Las  $\beta$ -arrestinas son capaces de promover la internalización del receptor al interactuar mediante su extremo C-terminal con la cadena pesada de la clatrina y con la subunidad  $\beta$ 2 del complejo adaptador de clatrina (AP2) <sup>136-139</sup>. La defosforilación de las  $\beta$ -arrestinas es necesaria para que se produzca la interacción con la clatrina ya que en su conformación basal, las  $\beta$ -arrestinas están fosforiladas en un residuo Serina (Ser412 en  $\beta$ -arrestina-1) o Treonina (Thr382 en  $\beta$ -arrestina-2) <sup>140,141,181</sup>.



La ubiquitinación de las  $\beta$ -arrestinas también regula el tráfico intracelular del complejo formado con el receptor. La ubiquitina es una proteína de 76 residuos, ubicua y muy conservada. La unión covalente de la ubiquitina a otras proteínas requiere de la actividad de una ubiquitina ligasa específica de sustrato y se efectúa a través de su residuo glicina C-terminal que une el grupo amino de un residuo lisina del sustrato. Su adición a las proteínas es un proceso muy regulado que requiere de tres actividades enzimáticas, E1, E2 y E3. La ubiquitina es activada por la enzima activadora de ubiquitina E1, transferida a la enzima conjugadora de ubiquitina E2 y, finalmente, transferida a un residuo lisina del sustrato por la enzima ubiquitina ligasa E3 <sup>142,143</sup>. Una de las ubiquitina ligasas E3 identificadas para las  $\beta$ -arrestinas en mamífero es Mdm2 <sup>144</sup>. En *Drosophila*, la ubiquitina ligasa E3 Deltex reclutada por la única arrestina no visual, Kurtz, también ubiquitina el receptor Notch <sup>145</sup>.

Se puede unir una única molécula de ubiquitina al sustrato (monoubiquitinación), varias moléculas de ubiquitina en distintos residuos lisina (multiubiquitinación) ó varias ubiquitinas a través de sus propios residuos lisina formando una cadena (poliubiquitinación). Las proteínas poliubiquitinadas pueden ser dirigidas a un complejo multiproteico, el proteosoma 26S, cuya función es degradar las proteínas <sup>146,147</sup>. La ubiquitinación también sirve de señal para la internalización de proteínas de membrana mediante endocitosis y su tráfico hacia el lisosoma (vacuola en levaduras) para su degradación. La ubiquitinación de las  $\beta$ -arrestinas regula el tráfico intracelular del complejo formado con el receptor una vez internalizado por endocitosis.



**Figura 11. Modelo para el tráfico intracelular de receptores GPCR y  $\beta$ -arrestinas.** La fosforilación del receptor por quinasas GRK en respuesta a un agonista conduce a la unión de la  $\beta$ -arrestina ( $\beta$ -arr) y a la internalización del complejo GPCR- $\beta$ -arr en vesículas revestidas de clatrina. La ubiquitinación (U) de la  $\beta$ -arrestina por la ubiquitina ligasa Mdm2 regula el reciclamiento del receptor a la membrana plasmática. En el caso de los receptores de tipo A, la  $\beta$ -arrestina se deubiquitina rápidamente, lo que provoca su disociación del receptor que puede dirigirse al endosoma tardío y posteriormente al lisosoma para su degradación ó reciclarse rápidamente a la membrana plasmática. En el caso de receptores de tipo B, la  $\beta$ -arrestina se mantiene ubiquitinada y unida al receptor más tiempo, lo que da lugar a un reciclamiento más lento del receptor a la membrana plasmática. Modificado de <sup>149</sup>

## INTRODUCCIÓN

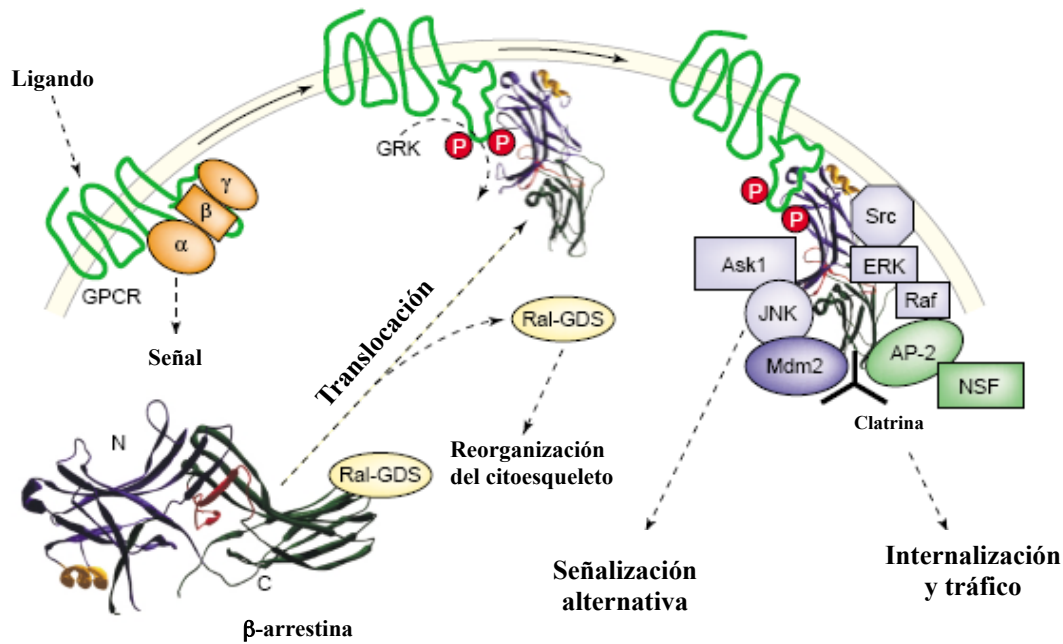
Las  $\beta$ -arrestinas también unen moléculas como fosfoinosítidos de membrana y proteínas como ARF6 (factor 6 de ADP-ribosilación) y ARNO (abridor del sitio de fijación del nucleótido en ARF). ARF6 es una pequeña proteína de unión a GTP y su activación requiere que se reemplace GDP por GTP, lo que es facilitado por la actividad GEF (factor de intercambio del nucleótido de guanina) de ARNO que se une de forma constitutiva a las  $\beta$ -arrestinas. La unión de las  $\beta$ -arrestinas con ARF6 y ARNO promueve la activación de ARF6 lo que provoca la internalización del receptor y la consecuente liberación de ARF6 del complejo <sup>148</sup>.

La forma de internalización más común es mediante vesículas revestidas de clatrina (CCPs), aunque existen vías alternativas como las mediadas por caveolas ó vesículas no revestidas. El mecanismo de internalización depende del tipo de receptor y del tipo celular en el que se exprese (Figura 11):

- GPCRs tipo A: pertenecen a este grupo los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  y  $\alpha_{1b}$  ( $\beta_2$ AR y  $\alpha_{1b}$ AR), los receptores de opioides- $\mu$ , de dopamina  $D_{1A}$  y los receptores endoteliales ( $ET_A$ R). Aunque estos receptores unen preferentemente la  $\beta$ -arrestina-2, también unen la  $\beta$ -arrestina-1 pero no interactúan con las arrestinas visuales. Su estimulación provoca una rápida translocación de las  $\beta$ -arrestinas a la membrana pero la unión con el receptor es transitoria, ya que las dos proteínas se disocian poco después de que se forme la vesícula revestida de clatrina, por lo que ambas moléculas no colocalizan en los endosomas. Se trata de un proceso rápido de desensibilización y reciclamiento del receptor.

- GPCRs tipo B: pertenecen a este grupo los receptores de neurotensina-1, vasopresina ( $V_2$ R), neurokininas ( $NK_1$ R) y angiotensina-II ( $AT_{1a}$ R) entre otros. Unen la arrestina visual y con igual afinidad, la  $\beta$ -arrestina-1 y la  $\beta$ -arrestina-2. En este caso, el complejo formado por el receptor y la  $\beta$ -arrestina es más estable y las dos proteínas colocalizan en los endosomas. El reciclamiento del receptor es por lo tanto más lento.

**Activación de rutas de señalización:** El complejo formado por el receptor activado y la  $\beta$ -arrestina sirve de andamio no solo para proteínas implicadas en endocitosis (clatrina, AP2, ARF6, ARNO, Mdm2) sino también para proteínas implicadas en señalización (Figura 12). Por ejemplo, las  $\beta$ -arrestinas reclutan la tirosina quinasa c-Src <sup>150</sup>. La  $\beta$ -arrestina-1 tiene motivos ricos en prolina (PXXP) en el dominio N-terminal entre los residuos 88-91 y 121-124, que interactúan con el dominio SH3 de c-Src. La unión de c-Src a la  $\beta$ -arrestina-1 conduce a la activación de cascadas de MAP quinasas. Una de estas cascadas, que incluye las quinasas c-Raf-1, MEK y ERK2, conduce a la fosforilación de la dinamina y a la estimulación de la degranulación de neutrófilos. Otras rutas MAP quinasas activadas por complejos receptor-arrestina, son la ruta p38/HOG1 y JNK3 (kinase 3 de la región N-terminal de c-Jun) que recluta ASK1 <sup>151,152</sup>. ERK controla la transición G0-G1 del ciclo celular y p38 y JNK3 están implicadas en la regulación del crecimiento celular, en apoptosis y en la activación de células inmunes y reticuloendoteliales en respuesta a estrés hormonal y medioambiental <sup>120</sup>. En los últimos años ha ido creciendo el número de moléculas señalizadoras activadas por las arrestinas que se conocen. En la lista de rutas activadas por las arrestinas se incluyen la ruta AKT y la de la PI-3 quinasa, entre otras. Además, las arrestinas unen también otras proteínas de membrana que no pertenecen a la familia de GPCR para regular su señalización y tráfico, como por ejemplo los receptores de TGF- $\beta$  y IGF-1, el receptor LDL, y el intercambiador de  $Na^+/H^+$  NHE<sub>5</sub> (revisado en <sup>116</sup>).



**Figura 12. Activación de rutas de señalización por la arrestinas.** Las arrestinas son proteínas citosólicas y pueden existir unidas a otras proteínas como Ral-GDS (molécula relacionada con la reorganización del citoesqueleto). Cuando un receptor es activado por un ligando y este se fosforila, la  $\beta$ -arrestina se transloca a la membrana plasmática, liberando Ral-GDS y uniéndose al receptor con gran afinidad. Los cambios conformacionales que sufre la arrestina promueven la internalización del receptor, su tráfico intracelular (al reclutar clatrina, AP2 y NSF) y la activación de otras rutas de transducción de señal como rutas de MAP quinastas (Src, Raf, ERKs, Ask1 y JNKs). La  $\beta$ -arrestina también recluta ubiquitina ligasas como Mdm2. Abreviaciones: AP-2, proteína adaptadora 2; Ask1, quinasa 1 reguladora de la señal apoptótica; ERK, quinasa regulada por señal extracelular; GPCR, receptor acoplado a proteína G; GRK, quinasa de receptor acoplado a proteína G; JNK, quinasa de la región N-terminal de c-Jun; Mdm2, ubiquitina ligasa doble minuto murino 2; NSF, factor sensible a N-etilmaleimida; Raf, quinasa Raf-1; Ral-GDS, estimulador de disociación Ral GDP; Src, tirosina quinasa c-Src. Modificado de <sup>153</sup>

La función de las arrestinas como adaptadores multifuncionales hace que el complejo receptor-arrestina sea capaz de regular un gran número de rutas de señalización, implicadas en múltiples procesos como apoptosis, movimiento celular (quimiotaxis, metástasis y migración) y desarrollo <sup>154</sup>.

La pérdida de función de la arrestina visual provoca una forma de ceguera nocturna congénita llamada enfermedad de Oguchi <sup>155</sup>. La pérdida de función de la única arrestina no visual Kurtz en *Drosophila* es letal, al igual que las deleciones simultáneas de los genes que codifican la  $\beta$ -arrestina-1 y la  $\beta$ -arrestina-2 en ratón. Sin embargo la pérdida de función de una sola de las arrestinas ( $\beta$ -arrestina-1 ó  $\beta$ -arrestina-2) en el ratón no provoca ningún fenotipo. Probablemente por esta razón no se ha encontrado ningún desorden relacionado con la pérdida de función de las arrestinas no visuales hasta el momento <sup>116</sup>.



## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS.

Al inicio de este trabajo, varios estudios indicaban una posible conexión entre la ruta *pal/RIM* de transducción de la señal de pH ambiental en hongos y la vía endocítica. El análisis por doble-híbrido de las interacciones entre los distintos genes del genoma de *S. cerevisiae* demostró que el homólogo de PalA en este organismo, Rim20, interacciona con Snf7 (Vps32), un componente de la maquinaria endocítica ESCRT asociada a la membrana del endosoma e implicada en la formación del cuerpo multivesicular<sup>99,156</sup>. Además, esta interacción está conservada entre PalA y Vps32 en *A. nidulans*<sup>40</sup>. Por otra parte, resultados obtenidos en el laboratorio mostraron que PalF interacciona con la proteína 7TM y putativo sensor de pH, PalH y esta funcionalmente relacionada con una familia de proteínas, las arrestinas, que actúan como adaptadores endocíticos en mamíferos. Estos resultados, en su conjunto, indicaban una posible relación entre la ruta de señalización por el pH ambiental y la vía endocítica en hongos.

En consecuencia, los objetivos principales que se plantearon al inicio de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

**A)** Analizar la posible implicación de la maquinaria endocítica ESCRT en la ruta de señalización por el pH ambiental en *A. nidulans*.

**1-**Estudiar el efecto de una mutación *vps* clase E que bloquea la disociación de la maquinaria ESCRT sobre la transducción de la señal de pH en *A. nidulans*.

**2-**Caracterizar la interacción entre Vps32 (un componente de ESCRT III) y PalA (una proteína de la ruta de señalización por el pH ambiental) en *A. nidulans* y, de forma más general, entre Vps32 y proteínas con dominio Bro1 en otros organismos (*S. cerevisiae* y *E. histolytica*).

**3-**Determinar si las proteínas de la ruta de señalización por el pH ambiental PalA, PalB y PacC forman un complejo *in vivo*.

**B)** Caracterizar la función de una proteína relacionada con las arrestinas en hongos y determinar si los mecanismos que regulan la función de las arrestinas como adaptadores endocíticos en mamíferos están conservados en hongos.

**4-**Analizar la función de PalF en *A. nidulans*: Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de PalF.

**5-**Determinar si la ruta *RIM* se activa en respuesta a un incremento del pH ambiental en *S. cerevisiae*.

**6-**Analizar la función de Rim8, el homólogo de PalF en *S. cerevisiae*: estudiar la posible conservación de los mecanismos de regulación de PalF y Rim8.





## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

##### 3.1.1. Medios y suplementos para *Aspergillus nidulans*.

La solución de sales, elementos traza y suplementos utilizados en los medios son los descritos por Cove<sup>157</sup>. Los cultivos se realizaron a 37°C, salvo indicación contraria. Los cultivos líquidos se inocularon con una suspensión de conidiosporas en Tween 80 al 0,01% y se cultivaron con agitación a 250 r.p.m.

##### 3.1.1.1. Medio Mínimo de *Aspergillus nidulans* (MMA).

Para 1 litro de medio se utilizaron 20 ml de solución de sales y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. Para el medio mínimo sólido se añadió agar Oxoid al 1,5% (p/v). El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Después de la esterilización, y antes de ser repartido en las placas Petri, se añadieron los suplementos necesarios para cada cepa, así como la fuente de carbono y la de nitrógeno, generalmente D-glucosa 1% (p/v) y tartrato de amonio 5 mM.

##### 3.1.1.2. Medio completo de *Aspergillus nidulans* (MCA).

Composición por litro: 20 ml de solución de sales, 10 ml de solución de casaminoácidos, 10 g de D-glucosa, 2 g de bactopectona y 1 g de extracto de levadura. Se añadió agua hasta un litro y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. Para el medio sólido se añadió agar al 1,5% (p/v). El medio se esterilizó en autoclave 20 minutos a 121°C. Antes de utilizar el medio, se le añadió 10 ml de solución de vitaminas y, en caso de necesitarse, los requerimientos específicos de cada cepa.

##### 3.1.1.3. Soluciones y suplementos para medios de *Aspergillus nidulans*.

###### Solución de sales<sup>157</sup>.

Para 1 litro (concentración 20X):

Cloruro de potasio .....	26 g
Sulfato de magnesio 7H <sub>2</sub> O .....	26 g
Fosfato dihidrógeno de potasio.....	76 g
Solución de elementos traza.....	50 ml

###### Solución de casaminoácidos.

Hidrolizado de caseína, 150 g/litro. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 minutos. Se utilizó como solución 10X.

###### Solución de elementos traza.

Para 1 litro (preparado 1000X):

Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .....	40 mg
CuSO <sub>4</sub> .....	400 mg
FeSO <sub>4</sub> +7H <sub>2</sub> O.....	800 mg

## MATERIALES y MÉTODOS

MgSO <sub>4</sub> .....	800 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .....	800 mg
ZnSO <sub>4</sub> .....	8 g

### Solución de vitaminas.

Para 1 litro (preparado como 100X)

Tiamina.....	50 mg
Biotina.....	10 mg
Ácido nicotínico.....	100 mg
Pantotenato de calcio.....	200 mg
Piridoxina-HCL.....	50 mg
Riboflavina.....	50 mg

Esta solución se esterilizó mediante filtración y se guardó a 4°C protegida de la luz.

### Vitaminas.

Se prepararon en agua a una concentración de 100X, excepto para la biotina que fue 10000X.

Biotina: 100 mg/l (esterilizada por filtración).

Ácido p-aminobenzoico (PABA): 200 mg/l. (esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos).

Pantotenato de calcio: 200 mg/l (esterilizado por filtración).

Piridoxina-HCL: (Vitamina B6): 5 g/l (esterilizado por filtración).

Inositol: 1,2 g/l (esterilizado por filtración).

### **3.1.2. Medios y suplementos para *Saccharomyces cerevisiae*.**

Todos los cultivos, tanto en medio sólido como líquido, se realizaron a 30°C. Los cultivos en medio líquido proceden de un precultivo en fase estacionaria. Se cultivaron con agitación a 250 r.p.m. hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento ( $D.O_{600}=0,6$ ).

#### **3.1.2.1. Medio Mínimo de levadura (SD).**

El medio líquido se preparó con una solución de D-glucosa al 2% en agua destilada, y para el medio sólido se añadió agar al 2% final (p/v). Una vez autoclavado a 121°C durante 20 minutos, se le añadió 1:10 (v/v) de YNB 10X “Yeast Nitrogen Base” y los aminoácidos complementarios necesarios para cada cepa y condición.

#### **3.1.2.2. Medio Completo de levadura (YPD).**

Composición por litro: 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 200 mg de Adenina. El pH se ajustó a 4,5 con HCl y el medio se autoclavó durante 20 minutos a 121°C. Una vez autoclavado, se añadió glucosa al 2% final. Para el medio sólido se añadió agar al 2% final (p/v).

#### **3.1.2.3. YNB 10X pH 4.5**

Composición por medio litro: 8,5g de YNB (sin sulfato amónico ni aminoácidos), 25 g de sulfato amónico y 2,9 g de la mezcla de aminoácidos. Se ajustó el pH a 4,5 con KOH y se esterilizó por filtración.

**3.1.2.4. Mezcla de aminoácidos**

L-Isoleucina.....	1,5 g
L-Arginina HCl.....	1 g
L-Fenilalanina.....	2,5 g
L-Valina.....	7,5 g
L-Lisina HCl.....	1,5 g
L-Treonina.....	10 g
Adenina.....	2,5 g
L-Metionina.....	1 g
L-Tirosina.....	1,5 g

**3.1.2.5. Aminoácidos complementarios.**

Los aminoácidos complementarios necesarios para cada cepa se prepararon a una concentración 100X de la necesaria en el medio.

L-Uracilo.....	2 g/l
L-Triptófano.....	2 g/l
L-Histidina.....	2 g/l
L-Leucina.....	10 g/l

**3.1.3. Medios para *Escherichia coli*.**

Se utilizó LB como medio general para el crecimiento y mantenimiento de cepas transformadas<sup>158</sup>. Este medio contiene: bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se añadió agar al 1,5 % (p/v) para el medio sólido. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina, se añadió este antibiótico (en forma de sal sódica) a una concentración final de 100 µg/ml tanto en medio sólido como líquido. Para transformantes resistentes a kanamicina, la concentración final del antibiótico fue de 50 µg/ml. Además, y en caso de realizarse la selección de recombinantes por ausencia de actividad β-galactosidasa, se añadió al medio X-gal a una concentración final de 83 mM y, según los casos, IPTG, a una concentración final de 100µM.

**3.2. CEPAS DE MICROORGANISMOS UTILIZADAS.****3.2.1. Cepas de *Aspergillus nidulans*.**

Las cepas utilizadas en esta tesis doctoral se resumen en la Tabla 2. Todas las estirpes portan la mutación *veA1* de pérdida de función en *veA*, “velvet”, que produce la conidiación en presencia de luz<sup>159</sup>. Los marcadores se describen en Clutterbuck<sup>160</sup>.

<i>Cepas</i>	<i>Característica Relevante</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Fuente</i>
MAD105	Silvestre	<i>yA2, pabaA1, glcA1</i>	J. Visser
MAD190	<i>palC4</i>	<i>yA2, pabaA1, biA1, manA2, palC4</i>	H. Arst (Londres)
MAD305	<i>pacCc14</i>	<i>pabaA1, pacCc14</i>	J.Tilburn (Londres)
MAD341	<i>palA1</i>	<i>yA2, pabaA1, argB2, palA1</i>	J.Tilburn (Londres)
MAD812	<i>pacC+/-</i>	<i>pantoB100, pacC+/-209</i>	H. Arst (Londres)
MAD855	<i>palB7</i>	<i>glrA1, inoB2, chaA1, palB7</i>	H. Arst (Londres)
MAD900	<i>palF15</i>	<i>pantoB100, glrA1, palF15</i>	H. Arst (Londres)
MAD976	<i>palI32</i>	<i>yA2, pabaA1, argB2, palI32</i>	S. Negrete (Londres)
MAD982	<i>palH17</i>	<i>yA2, pabaA1, argB2, palH17</i>	S. Negrete (Londres)
MAD1003	<i>palB::3HA</i>	<i>pantoB100, biA1, palB::3HA</i>	E. Díaz (Madrid)
MAD1152	<i>palF::3HA</i>	<i>pantoB100, glrA1, palF::3HA</i>	Este trabajo
MAD1158	<i>palA::3MYC</i>	<i>yA2, pabaA1, palA3::MYC</i>	Este trabajo
MAD1159	<i>palB::3HA</i>	<i>yA2, pabaA1, palB::3HA</i>	Este trabajo
MAD1160	<i>palA::3MYC, palB::3HA</i>	<i>yA2, pabaA1, palA::3MYC, palB3::HA</i>	Este trabajo
MAD1167	<i>palA::3MYC, palB::3HA</i>	<i>yA2, pabaA1, argB2, palA::3MYC, palB::3HA</i>	Este trabajo
MAD1395	<i>palA1, palF::3HA</i>	<i>pantoB100, argB2, glrA1, palA1, palF::3HA</i>	Este trabajo
MAD1396	<i>palC4, palF::3HA</i>	<i>pabaA1, pantoB100, manA2, palC4, palF::3HA</i>	Este trabajo
MAD1397	<i>palI32, palF::3HA</i>	<i>yA2, pantoB100, palF::3HA, palI32</i>	Este trabajo
MAD1398	<i>palB7, palF::3HA</i>	<i>pantoB100, glrA1, inoB2, palB7, palF::3HA</i>	Este trabajo
MAD1551	<i>palA::3MYC, palB::3HA, Vps4[E232Q]</i>	<i>yA2, pabaA1, palA::3MYC, palB3HA, ArgB2[ArgB*::alcAp::Vps4<sup>E232Q</sup>]</i>	Este trabajo
MAD1552	<i>palH17, palF::3HA</i>	<i>pantoB100, palF::3HA, palH17</i>	Este trabajo
MAD1554	<i>palA::3MYC, palB::3HA, pacC209</i>	<i>yA2, pabaA1, argB2, palA::3MYC, palB::3HA, pacC209</i>	Este trabajo
MAD1555	<i>palB::3HA, pacC209</i>	<i>yA2, pabaA1, argB2, palB::3HA, pacC209,</i>	Este trabajo
MAD1556	<i>palA::3MYC, pacC209</i>	<i>yA2, pabaA1, argB2, palA::3MYC, pacC209</i>	Este trabajo

**Tabla 2. Cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas.**

### 3.2.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este trabajo se han utilizado las cepas descritas en la tabla 3. Las cepas que expresan Rim101 etiquetado con un triple epítipo HA se obtuvieron mediante transformación integrativa de la cepa parental correspondiente con el vector pKR41 digerido con Nco1 y Pst1. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo en ausencia de Leucina. Las cepas obtenidas de Euroscarf están descritas en: <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>.

<i>Cepa</i>	<i>Característica Relevante</i>	<i>Genotipo</i>	<i>Referencia</i>
OVY7	Silvestre	<i>MATa ade2 his3 trp1 leu2 ura3 can1</i>	W303-1A
OVY15	doble-híbrido	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 gal4 gal80 URA3::lexAop-lacZ</i>	CTY10.5d
OVY24	Silvestre <i>RIM101-HA</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YHLO27W-HA::LEU2</i>	Este trabajo
OVY25	<i>rim8Δ RIM101-HA</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YGL046w::KanMX4 YHLO27W-HA::LEU2</i>	Este trabajo
OVY29	Silvestre	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>	Euroscarf Y00000
OVY31	<i>rim8Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YGL046w::KanMX4</i>	Euroscarf Y04414

OVY32	<i>rim101Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YHL027w::KanMX4</i>	Euroscarf Y00936
OVY33	<i>rim9Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YMR063w::KanMX4</i>	Euroscarf Y06196
OVY34	<i>rim13Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YMR154c::KanMX4</i>	Euroscarf Y06643
OVY35	<i>rim21Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YNL294c::KanMX4</i>	Euroscarf Y01150
OVY37	<i>dfg16Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YOR030w::KanMX4</i>	Euroscarf Y11806
OVY38	<i>rim20Δ</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YOR275c::KanMX4</i>	Euroscarf Y07333
OVY39	<i>rim9Δ RIM101-HA</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YMR063w::KanMX4 YHLO27W-HA::LEU2</i>	Este trabajo
OVY40	<i>rim13Δ RIM101-HA</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YMR154w::KanMX4 YHLO27W-HA::LEU2</i>	Este trabajo
OVY41	<i>dfg16Δ RIM101-HA</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YOR030w::KanMX4 YHLO27W-HA::LEU2</i>	Este trabajo
OVY42	<i>rim20Δ RIM101-HA</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YOR275c::KanMX4 YHLO27W-HA::LEU2</i>	Este trabajo
OVY43	<i>rim21Δ RIM101-HA</i>	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3 YNL294c::KanMX4 YHLO27W-HA::LEU2</i>	Este trabajo

**Tabla 3. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas.**

### 3.2.3. Cepas de *Escherichia coli*.

En este trabajo se ha utilizado las cepas de *E. coli* DH1 (F- *recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44*) y DH5α (F' *endA1 hsdR17 supE44 thi1 recA1 gyrA relA1 Δ(lacIZYA-argF)*) del tipo K-12 (las mutaciones en *E. coli* se describen en Bachman <sup>161</sup>). Las estirpes DH1 y DH5α se han utilizado como cepas de alta frecuencia de transformación, y en especial DH5α para la selección de plásmidos recombinantes utilizando *lacZ* como marcador de selección.

Para la expresión heteróloga de proteínas, hemos utilizado la cepa BL21 (F- *ompT hsdSB(rB-, mB-) gal dcm*) que carece de la actividad proteolítica de 2 proteasas (ión proteasa y proteasa de membrana externa), lo que reduce la degradación de algunas proteínas heterólogas expresadas en esta cepa.

### 3.3. VECTORES.

**pCR2.1Topo** (TOPO): Plásmido comercial de la casa Invitrogen, incluido en el kit de clonación “TOPO TA Cloning Kit” (Ref. K4500-01). Se utilizó para clonar fragmentos de PCR mediante el sistema “TOPO Cloning” de clonación de productos de PCR con topoisomerasas.

#### 3.3.1 Plásmidos utilizados para integración genómica en *A. nidulans*.

**pALC**: plásmido que contiene el promotor *alca*<sup>P162</sup>.

**pCR2.1Topo-palF::3HA** (pov41): Plásmido derivado de pCR2.1Topo-palF, que contiene la secuencia codificante de *palF* clonada en pCR2.1Topo. Mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos ov22 y ov23 (tabla 4), se generó un sitio *NotI* después del codon 185, donde posteriormente se introdujeron 3 copias del epítipo HA (3HA). Este epítipo proviene del plásmido pGTEP1 <sup>163</sup>, extraído como fragmento *NotI/NotI*. Este plásmido fue utilizado para liberar el transgen como un fragmento *EcoRI/EcoRI* y realizar el reemplazamiento genético del alelo de pérdida de función *palF15*, para dar lugar al alelo *palF::3HA* (Ver Figura 26).

**pUC18-palA::3MYC** (pov103): Este plásmido es derivado de pUC18-palA, que contiene el gen *palA* con promotor y terminador, clonado en pUC18. Mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos ov65 y

## MATERIALES y MÉTODOS

ov66 (ver tabla 4), se creó un sitio de restricción *NotI* en el extremo C-terminal de *pala*, donde se clonaron las 3 copias del epítipo MYC obtenidas mediante digestión con *NotI* del plásmido pMPY-3XMYC<sup>164</sup>. Este plásmido fue utilizado para liberar el transgen como un fragmento *SphI/XbaI* y realizar el reemplazamiento génico del alelo de pérdida de función *pala1*, para dar lugar al alelo *pala::3MYC* (Ver Figura 20).

**palcA<sup>P</sup>::vps4<sup>E232Q</sup>** (pov149): Este plásmido es derivado de pCR2.1Topo-vps4, que contiene la secuencia codificante de *vps4* de *A. nidulans* clonada en pCR2.1Topo. El mutante *vps4<sup>E232Q</sup>* se construyó mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos ov125 y ov126 (tabla 4). Se clonó el gen mutado (digiriendo con *BamHI*) en el plásmido pALC, que contiene el promotor *alcA<sup>P</sup>* y el gen mutado *argB2*. Este plásmido fue utilizado para expresar la proteína Vps4<sup>E232Q</sup> tras la integración del plásmido en el locus *argB*. (Ver Figura 14).

### 3.3.2. Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas *in vitro* y en *Escherichia coli*.

**pGEX5X1**: Plásmido comercial de la casa Pharmacia. Permite generar fusiones de la proteína Glutathion S-Transferasa (GST) a la parte N-terminal de cualquier proteína. Se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST.

**pGEX5X1-vps32** (pov176): Para construirlo, se amplificó la secuencia codificante de *vps32* de *A. nidulans* con los oligonucleótidos ov61 y ov62 (Tabla 4) a partir de una librería de cADN de *A. nidulans*. El producto de PCR se clonó en pCR2.1Topo y se comprobó mediante secuenciación. El fragmento se liberó con una digestión con *BamHI* y se introdujo en el plásmido pGEX5X1. Se utilizó para la expresión en *E. coli* de la fusión a GST de la proteína Vps32 de *A. nidulans*.

**pGEX5X1-Ehvps32** (pSH30): Para construirlo se amplificó la secuencia codificante de *Ehvps32* con los oligonucleótidos ov167 y ov168 (Tabla 4) a partir de ADN genómico de *E. histolitica*. El producto de PCR se clonó en pLex202+PL y se comprobó mediante secuenciación. El fragmento se liberó con una digestión *BamHI* y se introdujo en el plásmido pGEX5X1. Se utilizó para la expresión en *E. coli* de la fusión a GST de la proteína Vps32 de *E. histolitica*.

**pGEX5X1-SNF7** (pSH34): Para construirlo, se amplificó la secuencia codificante de *SNF7* con los oligonucleótidos ov198 y ov199 (tabla 4) a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae*. El producto de PCR se clonó en pCR2.1Topo y se comprobó mediante secuenciación. El fragmento se liberó con una digestión con *BamHI* y se introdujo en el plásmido pGEX5X1. Este plásmido se utilizó para la expresión en *E. coli* de la fusión a GST de la proteína Snf7 de *S. cerevisiae*.

**pD1-pala** (p1017): Este plásmido fue utilizado para expresar la proteína Pala mediante el sistema de transcripción/traducción *in vitro* TNT de Promega.

**pGBKT7** (p1302): Plásmido comercial de la casa Clontech. Se utilizó para la expresión *in vitro* de proteínas en el sistema TNT a partir del promotor T7.

**pGBKT7-EhADH112** (pSH33): Para construirlo, se amplificó la secuencia codificante de *EhADH112* con los oligonucleótidos ov140 y ov141 (Tabla 4) a partir de ADN genómico de *E. histolitica*. El producto de PCR se clonó en pCR2.1Topo y se comprobó mediante secuenciación. El fragmento se liberó mediante digestión con *BamHI* y se introdujo en el plásmido pGBKT7. Este plásmido se utilizó para la expresión *in vitro* de la proteína EhADH112 en el sistema TNT.



**pGBKT7-EhADH112(1-421)** (pSH56): Se obtuvo el fragmento *EhADH112(1-1261)* por digestión con *EcoRI* del plásmido pSH33 y se introdujo en el plásmido pGBKT7. Este plásmido se utilizó para la expresión *in vitro* de la región N-terminal de la proteína EhADH112 en el sistema TNT.

**pGBKT7-EhADH112(422-688)** (pSH57): Se digirió el plásmido pSH33 con *EcoRI* y se religó. Este plásmido se utilizó para la expresión *in vitro* de la región C-terminal de la proteína EhADH112 en el sistema TNT.

**pGBKT7-RIM20** (pSH37): Para construirlo, se amplificó la secuencia codificante de *RIM20* con los oligonucleótidos ov87 y ov88 (Tabla 4) a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae*. El producto de PCR se clonó en pCR2.1Topo y se comprobó mediante secuenciación. El fragmento se liberó con una digestión con *BamHI* y se introdujo en el plásmido pGBKT7. Este plásmido se utilizó para la expresión *in vitro* de la proteína Rim20 en el sistema TNT.

**pRSET**: Plásmido comercial de la casa Novagen. Se utilizó para la expresión *in vitro* de proteínas en el sistema TNT a partir del promotor T7.

**pRSET-BRO1** (pSH36): Para construirlo, se amplificó la secuencia codificante de *BRO1* con los oligonucleótidos ov85 y ov86 (Tabla 4) a partir de ADN genómico de *S. cerevisiae*. El producto de PCR se clonó en pCR2.1Topo y se comprobó mediante secuenciación. El fragmento se liberó con una digestión doble con *XhoI* y *KpnI* y se introdujo en el plásmido pRSET. Este plásmido se utilizó para la expresión *in vitro* de la proteína Bro1 en el sistema TNT.

### 3.3.3 Plásmidos utilizados en *Saccharomyces cerevisiae*.

**pACT2**: Plásmido comercial de la casa Clontech. Se utilizó para expresar fusiones de proteínas al dominio de activación de Gal4 (Gal4<sup>AD</sup>) y analizar su interacción con otras proteínas en el sistema de Doble-Híbrido.

**pLex202+PL**: Se utilizó para expresar fusiones de proteínas al dominio de unión a ADN de LexA (LexA<sup>DBD</sup>) y analizar su interacción con otras proteínas en el sistema de doble-híbrido<sup>165</sup>.

**pLex202+PL-palA** (pov5): Este plásmido es derivado de pCR2.1Topo-*palA*, que contiene la secuencia codificante de *palA* clonada en pCR2.1Topo. El fragmento con el gen *palA* se liberó con una digestión doble *EcoRI/BglII* y se introdujo en el plásmido pLex202+PL. Se utilizó para expresar en el sistema de doble-híbrido la fusión LexA<sup>DBD</sup>::PalA.

**pLex202+PL-palA(1-733)** (pov106): Se introdujo en el plásmido pLex202+PL un fragmento que expresa PalA(1-733). Este fragmento se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos ov15 y ov99 (Tabla 4) a partir de pov5. Se utilizó para expresar en el sistema de doble-híbrido la fusión LexA<sup>DBD</sup>::PalA(1-733).

**pLex202+PL-palA(303-733)** (pov108): Se introdujo en el plásmido pLex202+PL un fragmento que expresa PalA(303-733). Este fragmento se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos ov101 y ov99 (Tabla 4) a partir de pov5. Se utilizó para expresar en el sistema de doble-híbrido la fusión LexA<sup>DBD</sup>::PalA(303-733).

**pLex202+PL-palA(375-798)** (pov39): Se introdujo en el plásmido pLex202+PL un fragmento que expresa PalA(375-798). Este fragmento se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos ov18 y ov19 (Tabla 4) a partir de pov5. Se utilizó para expresar en el sistema de doble-híbrido la fusión LexA<sup>DBD</sup>::PalA(375-798).

## MATERIALES y MÉTODOS

**pLex202+PL-*palA*(1-664)** (pov107): Se introdujo en el plásmido pLex202+PL un fragmento que expresa *PalA* (1-664). Este fragmento se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos ov15 y ov100 (Tabla 4) a partir de pov5. Se utilizó para expresar en el sistema de doble-híbrido la fusión LexA<sup>DBD</sup>::*PalA*(1-664).

**pLex202+PL-*palA*(1-543)** (pov60): Este plásmido es derivado del plásmido pov5, digerido con *Sall* y religado. Se utilizó para expresar en el sistema de doble-híbrido la fusión LexA<sup>DBD</sup>::*PalA*(1-543).

**pLex202+PL-*palA*(1-337)** (pSH42): Se introdujo en el plásmido pLex202+PL un fragmento que expresa *PalA*(1-337). Este fragmento se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos ov240 y ov16 (Tabla 4) a partir de pov5. Se utilizó para expresar en el sistema de doble-híbrido la fusión LexA<sup>DBD</sup>::*PalA*(1-337).

**pACT2-*pacC*(341-678)** (pov12): Un fragmento que expresa *PacC*(341-678) se obtuvo del plásmido pSpacC<sup>28</sup> mediante digestión con *BamHI* y *BclI*, y se introdujo en pACT2. Se utilizó para expresar en el sistema de Doble-Híbrido la fusión Gal4<sup>AD</sup>::*PacC*(341-678).

**pACT2-*vps32*** (pov83): La secuencia codificante de *vps32* se obtuvo del plásmido pOV176 mediante digestión con *BamHI* y se introdujo en pACT2. Se utilizó para expresar en el sistema de Doble-Híbrido la fusión Gal4<sup>AD</sup>::*AnVps32*.

**pKR41**: Plásmido que permite el reemplazamiento génico de *RIM101* por *RIM101::3HA*<sup>166</sup>.

**pRS313-*RIM8::3HA*** (p081): Un fragmento genómico con el gen *RIM8*, su promotor (1kb) y su terminador (0.5kb), se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos ov180 y ov181 (Tabla 4) y se clonó en pCR2.1Topo. Este fragmento de ADN se aisló con las enzimas *BamHI* y *Clal* y se clonó en un plásmido derivado de pRS313<sup>167</sup> en el cual el sitio *NotI* ha sido eliminado mediante una digestión con *NotI* y tratamiento con klenow. Mediante mutagénesis dirigida se creó un sitio *NotI* después del codón 185 en *RIM8*, con los oligonucleótidos ov265 y ov266 (Tabla 4), donde se introdujeron las tres copias del epítipo HA, extraído como fragmento *NotI/NotI* desde el plásmido pGTEP1<sup>163</sup>. El plásmido centromérico obtenido se utilizó para expresar *Rim8::3HA* en la levadura *S. cerevisiae*.

**Yep96**: Este plásmido contiene el gen *UBI4* que codifica la ubiquitina bajo el control del promotor inducible por cobre *pCUP1*<sup>168</sup>.

### 3.3.4. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral se resumen en la Tabla 4.

<b>OLIGO</b>	<b>SECUENCIA 5'-3'</b>
OV15	CGATGATGAAGATACCCACC
OV16	CGTCAGCAGAGCTTCACCATTG
OV18	GGGGGATCCCGGACAGGAGACCGTCTTG
OV19	CCGCTCGAGTTAGAGGTGTCCGCAGGGTTG
OV22	CCAAACCTACAACCTATGAGCGGCCCGCCGACATTATCATGCCGAAG
OV23	CTTCGGCATGATAATGTCGGGCGGCCGCTCATAGTTGTAGTTTGG
OV26	CGCGGTAGATCCCATCGGG
OV40	GCCGCACTGAGCAGCGTAATC
OV41	CTCGGTGATACTGTGAGACCC
OV47	GGGGGATCCGAATGAGCAATACCGACTTCCTTGGC
OV48	ATCCTAAGCACCCCTCACTTCCGAACCTTG
OV61	GGGGGATCCAAATGTGGTTCATGGTTCGGTG
OV62	GGGGGATCCTCACATGGCCATTTCCGCGC
OV65	CAACCCTGCGGACACCTCTGCGGCCGCTAACAGCGCCCCAGCCAAC
OV66	GTTGGCTGGGGCGCTGTTAGCGGCCGAGAGGTGTCCGCAGGGTTG
OV73	CCCCAACCTCAACCTCCGTC
OV85	GGGGGATCCTCATGAAACCTTACTTATTTGACC

OV86	GGGGGATCCTAACTGCTGTATTTGGAGTAC
OV87	GGGGGATCCACATGAGTGAAGTCTTGCCATTCC
OV88	GGGGGATCCTCATTGGTCTTCAAATGTCAAAC
OV99	CCGGAATTCACATTGCGGCGACGCTGGATATG
OV100	CCGGAATTCATGTAGAAGCATCACCCGTATGG
OV101	CCGGAATTCCTGAAGCGCGCCGAGAAGGAC
OV113	AGGGGACCACATCCCTGGCG
OV125	CCATCATCTTCATTGACCAAGTTGATGCACTCTGC
OV126	GCAGAGTGCATCAACTTGGTCAATGAAGATGATGG
OV135	GGGGTACCTCTAGAGTCTGCTCTCCAGG
OV136	GGGGTACCTCTAGACTGATGATGCAGTGG
OV140	GGGGGATCCAGATGAATAGACAATTCATTCCTG
OV141	GGGGGATCCTTAAAGAGATGGAAACATAGGATTGG
OV167	GGGGGATCCAAATGTCTTGGTTCAGAAGAAATAC
OV168	GGGGGATCCTTACATAAGTTCAGCTAATTCATCTTC
OV180	GGGGGATCCACATGTCGTTACTGAGACTGTGG
OV181	GGGGGATCCTTAATAGTCATCACAAGGGGGGAG
OV198	GGGGGATCCGCATGTGGTCATCACTTTTTGGTTGG
OV199	ATAGGATCCTCAAAGCCCCATTTCTGCTTGTAG
OV240	GAAGATCTACGCCTTAGCCGCAACCATAAC
OV243	GGGTACCATGACATCGTTACTTGATAAAGG
OV244	GGGATCCTTATCCATCTTGTCCAAATTTGTTTCAG
OV245	GCCAAGTATTATATTTGTTGATCAAGTTGATTCGTTATG
OV246	CATAACGAATCAACTTGATCAACAAATATAATACTTGGC
OV247	CAGACAACGTAGACTACTCCAGG
OV265	GAATCCCTCAACAACATCAGCGGCCGCAAAAACCGGAAGCAAG
OV266	CTTGCTTCCGGTTTTTTGCGGCCGCTGATGTTGTTGAGGGATTC
5° palB	GAGCCAACAAGTTTCTGCAG
3° palB	TGAAGTGACACAGCTTCCATG

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral.**

### 3.4. TÉCNICAS DE *Aspergillus nidulans*.

#### 3.4.1. Crecimiento en medio líquido de *Aspergillus nidulans*.

Para el crecimiento en medio líquido de *A. nidulans*, se ha utilizado medio completo (MCA) ó medio mínimo (MMA) (descritos en el apartado 3.1.1) según se describa en cada ensayo, con los requerimientos específicos de la cepa utilizada en cada experimento.

El pH del medio ácido se ajustó a pH 4,7 con 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ó bien a pH 4 con 50 mM de citrato de sodio. El pH del medio alcalino se ajustó con 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH final 8,15) ó 100 mM HEPES y NaOH (pH final 8,7).

Para los experimentos de cambio de pH, el hongo se cultivó en 50 ml de medio ácido durante 17 horas a 37°C con agitación orbital. A continuación, se recogió el micelio por filtración y se transfirió a 50 ml del mismo medio tamponado a pH alcalino, creciendo el cultivo durante 30 minutos más. El pH antes y después del cambio de medio fue 3.8 y 8.4. Se recogieron muestras del cultivo en medio ácido y a los 30 minutos tras el cambio de pH del medio, se separó el micelio por filtración, se congeló inmediatamente en nieve carbónica y se liofilizó en un liofilizador Cryodos (Telstar). El liofilizado se utilizó para la extracción de proteínas totales.

Para los experimentos de inducción del promotor *alcA<sup>P</sup>*, se cultivó el hongo en MMA con glucosa 0,02% como fuente de carbono durante 17 horas, siendo luego transferido el micelio a MMA conteniendo 1% Etanol como fuente de carbono inductora del promotor durante 1-4 horas.

### 3.4.2. Crecimiento en medio sólido para análisis fenotípicos.

Los análisis fenotípicos llevados a cabo en este trabajo fueron realizados en MMA sólido (ver apartado 3.1.1) con agar Oxoid y los suplementos adecuados. Los resultados se evaluaron tras 1-2 días de crecimiento a 37°C.

- **Ensayo de sensibilidad a pH alcalino:** El medio se ajustó a pH 8 añadiendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a una concentración final de 100 mM.
- **Ensayo de sensibilidad a Molibdato:** Se añadió 6 mg/ml (25 mM) de Molibdato sódico al medio.
- **Ensayo de sensibilidad a neomicina:** Se añadió 2 mg/ml de sulfato de Neomicina al medio.

### 3.4.3. Crecimiento con etanol o glicerol como fuente de carbono.

Se añadió 1% de Etanol ó 3% de Glicerol, como fuentes de carbono inductoras del promotor *alcA*<sup>P</sup>.

### 3.4.4. Transformación de *Aspergillus nidulans*.

La transformación se realizó esencialmente mediante el protocolo descrito por Tilburn y colaboradores<sup>169</sup>. Se inocularon 3x10<sup>6</sup> conidiosporas en 400 ml de MMA con 5 mM tartrato amónico como fuente de nitrógeno y 1% (p/v) D-Glucosa como fuente de carbono, además de los requerimientos apropiados para cada cepa. El cultivo se incubó durante 16 a 18 h a 30°C y el micelio se recogió por filtración y se lavó con agua destilada estéril. Se resuspendió 1-3 g de micelio en 15 ml de Solución 2 (MgSO<sub>4</sub> 1,2 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 5.8), fría y estéril. El tratamiento para destruir la pared celular se realizó con la mezcla de enzimas Glucanex (Novo Nordisk. Ref. CH-4243). Se utilizaron 100-200 mg de Glucanex por gramo de micelio. La suspensión se preincubó durante 5 minutos a 4°C, pasados los cuales se incubó a 30°C en un baño de agua con agitación suave durante 2 h, comprobándose la formación de protoplastos al microscopio.

En dos tubos Corex estériles se depositaron 15 ml de Solución 5 (D-Sorbitol 0.6M, Tris-HCl 0.1M, pH 7.5) fría y estéril. A la suspensión de protoplastos se le añadieron otros 15 ml de Solución 2, se resuspendió y se añadió a partes iguales por debajo del colchón de Solución 5 de cada Corex, cuidando no perturbar las fases que se forman. Tras la centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 6.000 r.p.m. en un rotor HB4 (Sorvall), los protoplastos, que forman una banda en la interfase, se recogieron con una pipeta Pasteur estéril y se diluyeron en 2 volúmenes de Solución 6 (D-Sorbitol 1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5). La suspensión se centrifugó a 4.000 r.p.m. y 4°C durante 10 minutos en el rotor HB4, se eliminó el sobrenadante por decantación y los protoplastos se lavaron con 1 ml de Solución 6, resuspendiéndolos y centrifugándolos en un tubo eppendorf a 5.000 r.p.m. tres veces. Después de estos lavados, los protoplastos se contaron al microscopio y se concentraron por centrifugación. Se resuspendieron en el volumen adecuado de Solución 7 (D-Sorbitol 1M, Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.5) para obtener 5x10<sup>8</sup> protoplastos/ml. En un tubo Falcón de 50 ml estéril, se mezcló 200 µl de la suspensión de protoplastos con el ADN transformante (1 a 3 µg) y se añadió 50 µl de Solución 8 (PEG 6000 60% (p/v), Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 10 mM), mezclando con suavidad. La suspensión se incubó 20 minutos en hielo y se añadió 1 ml adicional de Solución 8, mezclándose bien y manteniéndose la suspensión a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 5 ml de Solución 7 a cada tubo, se mezcló suavemente y se añadieron 15 ml de "Top agar" (sacarosa 1M, agar 0.25% (p/v)) a cada tubo, fundido y atemperado a 48°C, mezclándose las dos soluciones mediante inversión. Finalmente se vertieron y extendieron 5

ml de la mezcla por placa de medio de regeneración (sacarosa 1M, glucosa 1% (p/v), tartrato amónico 5 mM, agar 1% (p/v)) preparada con los requerimientos adecuados.

#### 3.4.4.1. Integraciones en el locus *palA*.

La cepa MAD341 (ver tabla 2) se transformó con un fragmento lineal del plásmido pUC18-*palA::3MYC* obtenido mediante digestión con *SphI* y *XhoI*. Esta cepa contiene una mutación en el gen *palA*, en el residuo 635, que produce una pérdida total de función. La transformación con este fragmento persigue la reparación del gen gracias a la secuencia del transgen, mediante un doble sobrecruzamiento (ver Figura 20), de manera que quedará integrado el alelo *palA::3MYC* en su propio locus. La cepa se seleccionó en medio de regeneración con 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8.0) para que las cepas que no hayan reparado el gen no sean capaces de crecer. Los transformantes se purificaron en un medio no restrictivo y se analizó la presencia del triple epítipo MYC mediante PCR. Los transformantes preseleccionados mediante PCR fueron analizados mediante “Southern-blot”, con una sonda radiactiva formada por un fragmento de *palA*, para comprobar que la integración era única y correcta.

#### 3.4.4.2. Integraciones en el locus *palF*.

La cepa MAD900 (ver tabla 2) se transformó con un fragmento lineal del plásmido pCR2.1Topo-*palF::3HA* obtenido mediante digestión con *EcoRI*. Esta cepa contiene una mutación en el gen *palF* en el residuo 567, que produce una pérdida total de función. La transformación con este fragmento persigue la reparación del gen gracias a la secuencia del transgen, mediante un doble sobrecruzamiento (ver Figura 26), de manera que quedará integrado el nuevo alelo *palF::3HA* en su propio locus. Las cepas se seleccionaron en medio de regeneración con 100mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8.0) para que las cepas que no hayan reparado el gen no sean capaces de crecer. Los transformantes se purificaron en un medio no restrictivo y se analizó la presencia del epítipo 3HA mediante PCR. Los transformantes preseleccionados mediante PCR fueron analizados mediante “Southern-blot”, con una sonda radiactiva formada por un fragmento de *palF*, para comprobar que la integración era única y correcta.

#### 3.4.4.3. Integraciones en el locus *argB* de construcciones bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa I (*alcA<sup>P</sup>*).

El plásmido *palcA<sup>P</sup>::vps4<sup>E232Q</sup>*, el cual incluye una copia del gen *argB* mutada por digestión, rellenado y religado de un sitio único *BglIII*, se utilizó para transformar la cepa MAD1167 (ver tabla 2), que es portadora de la mutación *argB2*. La presencia de las dos mutaciones en *argB* deja una ventana de recombinación de alrededor de 500 pb para obtener un gen silvestre. Este suceso simple de recombinación homóloga se seleccionó en medio carente de arginina, tras lo que se purificaron los transformantes obtenidos estriando las conidiosporas en medio sin arginina para descartar sucesos de heterocariosis.

#### 3.4.5. Extracción de proteínas totales de *A. nidulans*.

Para la preparación de extractos proteicos totales de *A. nidulans*, se recogieron 0,25 g de micelio filtrado y escurrido en tubos de 2 ml con tapón de rosca. Este micelio se congeló a -80°C y se liofilizó en un liofilizador Cryodos (Telstar). Se añadió una bola de cerámica de 0,55 cm procedente del kit FastADN®Kit de BIO 101 (Q-

## MATERIALES y MÉTODOS

Biogen) y se pulverizó el micelio con un pulso de 15 segundos a fuerza 4,0 en el FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant. A continuación, se añadió 1 ml de tampón IP (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10%, Ditiotreitól (DTT) 1 mM, Triton 0.1%, N-Etilmaleimida (NEM (inhibidor de deubiquitinatas), Sigma) 5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche)) y se resuspendió el micelio pulverizado mediante agitación con vortex unos segundos. Se añadió 0,5 ml de perlas de vidrio de 0.45mm de diámetro (Glasperlen) y tampón IP hasta completar el tubo y se rompió el micelio con un pulso de 20 segundos a fuerza 6,0 en el FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant. Finalmente, se centrifugó cada muestra durante 30 minutos a 15.000 g y 4°C, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford<sup>170</sup>.

Para los ensayos de “Western-blot”, se precipitaron 50 µg de proteína con ácido tricloroacético (concentración final 10% (v/v)). El precipitado se lavó con una mezcla de Etanol/Eter 1/1 y 1/3 y se resuspendió en 20 µl de tampón de ruptura TR (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 5% β-mercaptoetanol; 6 M urea y 0,05% azul de bromofenol).

### 3.4.6. Extracción de ADN genómico de *A. nidulans*.

Las conidiosporas de las cepas de interés se inocularon en 20 ml de MMA con D-glucosa al 1% (p/v) como fuente de carbono, tartrato amónico 5 mM como fuente de nitrógeno y los demás requerimientos de la estirpe. Los cultivos se incubaron 14 horas a 30°C y se recogió el micelio por filtración, congelándolo inmediatamente en hielo seco y liofilizándolo durante la noche. Se añadió una bola de cerámica de 0,55 cm procedente del kit FastADN®Kit de BIO 101 (Q-Biogen) y se pulverizó el micelio con un pulso de 15 segundos a fuerza 4,0 en el FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant. Se añadieron 500 µl de una solución HEPES 10 mM pH 6,9, sacarosa 0,5 M y EDTA 20 mM pH 8 y 500 µl de una solución Tris-HCl 50 mM y EDTA 20 mM pH 8. A continuación, se mezcló por inversión. Se añadieron 100 µl de una solución de SDS 10% (concentración final 0,1% (v/v)), se mezcló por inversión e se incubó a 65°C durante 15 minutos. Se quitó la bola de cerámica y se extrajeron las proteínas del lisado con 1 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (49:49:2), mezclando por inversión durante 5 minutos. Se centrifugó durante 5 minutos a 13000 r.p.m. y se recogió la fase acuosa. Se repitió la extracción con 1 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (96:4) para eliminar los restos de fenol y se recogió el sobrenadante. Se precipitaron los ácidos nucleicos durante 15 minutos a temperatura ambiente después de añadir 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 6,0 y 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclando bien por inversión. Se recogió el precipitado mediante centrifugación (5 minutos a 13000 r.p.m.), se añadió 0,5 ml de etanol al 70% (v/v) y se volvió a centrifugar 5 min, eliminando los restos de etanol con una pipeta y secando al vacío. Se resuspendió el precipitado en 200 µl de agua, se añadieron 2 µl de RNasa y se incubó 30 minutos a 37°C. Se repitió la precipitación y el lavado con etanol 70% de la misma forma que antes, se secó el precipitado al vacío y resuspendió en 100 ó 200 µl de TE.

### 3.4.7. Cruces entre cepas de *A. nidulans*.

Los cruces entre cepas se realizaron mediante inóculos puntuales de ambas estirpes en una misma placa de MCA suplementado con los requerimientos de ambas, favoreciendo así la anastomosis entre hifas de dos estirpes parentales. La identificación de cleistotecios híbridos requiere que las estirpes parentales tengan distintos requerimientos nutricionales e, idealmente, distintos marcadores de color de las esporas. Una vez favorecida la

anastomosis (2-3 días de crecimiento a 37°C), se recortaron pequeñas porciones de medio sólido en las zonas donde habían entrado en contacto las hifas de ambas estirpes parentales y se traspasaron a placas de MMA selectivo. Este medio permite sólo el crecimiento de los heterocariotes, y está suplementado con glucosa al 1% como fuente de carbono y tartrato amónico 5 mM y nitrato de sodio 10mM como fuentes de nitrógeno. Las placas se incubaron a 37°C hasta que se formaron sectores heterocarióticos.

Para favorecer la entrada en el ciclo sexual, las placas de MMA con los sectores heterocarióticos se sellaron con el fin de someter al hongo a condiciones de anaerobiosis. Los cleistotecios se formaron a los 10-15 días de incubación a 37°C. Éstos se recogieron de la placa con una aguja estéril, se depositaron en una placa de agar al 1,5% (p/v) solidificado y se rodaron sobre el agar hasta que se desprendieron las células de Hülle. Posteriormente, cada cleistotecio se introdujo en un tubo Eppendorf con 100 µl de agua estéril. Las ascosporas se liberaron después de la rotura del cleistotecio contra las paredes del tubo. Se estriaron 5 µl de esta solución en una placa de MMA selectivo y se cultivaron dos días a 37°C para comprobar si el cleistotecio era híbrido. El genotipo de las ascosporas de los cleistotecios cruzados se analizó en placas de MMA selectivas para cada uno de los marcadores de las estirpes parentales.

### **3.5 TÉCNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae*.**

#### **3.5.1. Crecimiento en medio líquido y en medio sólido de *S. cerevisiae*.**

Para el crecimiento en medio líquido de *S. cerevisiae*, se ha utilizado medio completo (YPDA) ó medio mínimo (SD) (descritos en el apartado 3.1.2) con los requerimientos específicos de la cepa utilizada en cada experimento. El crecimiento de cultivos de levadura en medio líquido se cuantificó midiendo la densidad óptica a 600 nm. La temperatura de crecimiento fue 30°C y los cultivos fueron sometidos a agitación de intensidad media.

#### **3.5.2. Transformación de *S. cerevisiae*.**

La cepa para transformar se inoculó en medio completo YPAD y se cultivo a 30°C hasta la fase logarítmica de crecimiento ( $D.O_{600}=0,6$ ). Se centrifugó el cultivo a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó la levadura con agua estéril y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 4000 r.p.m., para finalmente resuspenderla en TeLiAc (TE, LiAc 0,1M) (100µl de TeLiAc por cada 5ml de cultivo). Se añadieron 50µl de suspensión de levadura en cada tubo eppendorf preparado con 20 µg de ADN “carrier” (ADN de esperma de salmón desnaturalizado tras hervirlo a 100°C durante dos minutos) y 100 ng del plásmido a transformar. A continuación, se añadieron 250µl de TeLiPEG (TE, LiAc 0,1M y 40% PEG3350) y cada tubo se agitó con vortex durante 15 segundos. Los tubos se incubaron 30 minutos a 30°C y 15 minutos a 42°C (choque térmico). Finalmente, se centrifugaron 1 minuto a 13000 r.p.m, descartando el sobrenadante. La levadura se resuspendió en 50 µl de agua y se sembró en placas de medio mínimo SD con los aminoácidos complementarios necesarios, excluyendo el correspondiente al marcador del plásmido transformado. Los transformantes se cultivaron a 30°C durante 3 ó 4 días.

#### **3.5.3. Extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae*.**

Para la extracción del ADN genómico, *S. cerevisiae* se cultivó hasta fase estacionaria a 30°C en medio mínimo SD. Se centrifugaron 1,5 ml del cultivo, 1 minuto a 13000 r.p.m, se eliminó el sobrenadante y se

## MATERIALES y MÉTODOS

añadieron 200µl de tampón de extracción (2% Tritón X100, 1% SDS, NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM pH8), 0,3g de bolas de vidrio 0,45mm y 200µl de fenol Sevag. Se agitó con vortex durante 2 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 13000 r.p.m. Finalmente, se recogió una fracción limpia de la fase superior acuosa y se utilizó 1 µl para reacciones de PCR.

### 3.5.4. Extracción de proteínas totales de *S. cerevisiae*.

Para la extracción de las proteínas totales de *S. cerevisiae*, se cultivó la levadura en medio mínimo SD (pH inicial 4,7 / pH final 3,5) hasta la fase logarítmica de crecimiento (D.O.<sub>600</sub>=0,6). La mitad del cultivo se utilizó para incrementar el pH del medio hasta pH 7 con 10 mM KOH.

#### Método 1

Se centrifugó el equivalente de 15 ml de cultivo a D.O.<sub>600</sub> de 0,6 a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la levadura en 400 µl de tampón IP (ver apartado 3.4.5) y se pasó a un tubo de vidrio (kimax) con 1 g de bolas de vidrio 0,45mm. Se agitó con el vortex 10 veces durante 10 segundos pasando por hielo cada vez. El lisado se recogió con una pipeta, se pasó a un tubo eppendorf y se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford <sup>170</sup>. Para los ensayos de “Western-blot”, se utilizaron 50 µg de proteína resuspendida en tampón de carga SB (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% Glicerol; 2% β-mercaptoetanol; 0,025% azul de bromofenol)

#### Método 2

Se centrifugó el equivalente de 1 ml de cultivo a D.O.<sub>600</sub> de 0,6, a 13000 r.p.m. durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la levadura en 50µl de tampón de carga SB. Se añadieron 0,1g de bolas de vidrio 0,45mm y se hirvió inmediatamente durante 3 minutos. Se agitó con el vortex durante 30 segundos, se volvió a hervir durante 3 minutos y se agitó con el vortex 30 segundos más. Finalmente, se centrifugó el tubo 1 minuto a 13000 r.p.m. y se utilizaron 10 µl del sobrenadante para ensayos de “Western-blot”.

### 3.5.5. Sistema de doble-híbrido

El sistema de doble-híbrido en *S. cerevisiae* se utilizó para probar la interacción entre dos proteínas. Se co-transformó la cepa CTY10.5d (ver 3.2.2) con plásmidos derivados de los vectores pLex202+PL (que permite la expresión de una fusión de la proteína de interés con el dominio de unión a ADN, LexA) y pACT2 (que permite la expresión de la segunda proteína fusionada al dominio de activación transcripcional de Gal4) (ver 3.2.3). La cepa CTY10.5d tiene integrada en su genoma una construcción con el gen reportero *lacZ* bajo el control de un promotor con varias copias del operador LexA. La interacción entre dos proteínas se reveló mediante la detección de la actividad β-galactosidasa en ensayos de filtro. Los transformantes fueron replicados a un filtro de nitrocelulosa y incubado durante 1h a -80°C para permeabilizar las células. Posteriormente, este filtro se incubó con tampón Z (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>) con 2.7 µl/ml de β-mercaptoetanol y 0.1% X-Gal. El filtro se incubó durante una hora a 30 °C para detectar el color azul que proviene de la oxidación y precipitación del indol, producto de la hidrólisis del X-Gal por la β-galactosidasa.



### 3.6. TÉCNICAS GENERALES DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 3.6.1. Inmunoprecipitación con resina acoplada al anticuerpo anti-HA.

Se utilizó una resina con anticuerpo anti-HA acoplado covalentemente (Roche ref. 11815016001) para inmunoprecipitar proteínas etiquetadas con un triple epítipo HA. En primer lugar, la resina se lavó 3 veces con 1 ml del tampón IP (ver apartado 3.4.5). Después, se añadió tampón IP al extracto de proteínas totales (*A. nidulans*: 2 mg / *S. cerevisiae*: 0,5 mg) hasta completar 0,5 ml y se incubó el extracto con la resina en una rueda giratoria durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, la resina se lavó con 1 ml de tampón IP durante 10 minutos en la rueda giratoria. El proceso de lavado se repitió 3 veces. En el último lavado, se eliminó completamente el sobrenadante y se añadieron 20µl de tampón de ruptura TR (ver apartado 3.4.5)

#### 3.6.2. Coimmunoprecipitación con resina acoplada a proteína A.

Se utilizó una resina con proteína A acoplada covalentemente (Amersham Biosciences ref. 17528001) para inmunoprecipitar proteínas etiquetadas con un triple epítipo MYC con el objetivo de detectar la posible coimmunoprecipitación de proteínas adicionales. Se preincubaron 200 µg de un extracto de proteínas totales con la resina (prelavada 3 veces con 1 ml del tampón IP (ver apartado 3.4.5)) durante 1 hora a 4°C en la rueda giratoria, para eliminar proteínas que interaccionan con la resina de forma inespecífica. Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Este sobrenadante se incubó con 2,5 µl de un anticuerpo monoclonal anti-MYC (Santa Cruz biotechnology) en una rueda giratoria durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante, el cual se incubó durante otra hora a 4°C en la rueda giratoria con resina previamente lavada. Se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 20 segundos, se descartó el sobrenadante y se lavó 3 veces la resina con 1 ml de tampón IP durante 10 minutos. En el último lavado, se eliminó completamente el sobrenadante y se añadieron 20µl de tampón de ruptura TR (ver apartado 3.4.5).

#### 3.6.3. Tratamientos con proteína fosfatasa del fago lambda.

Para realizar este ensayo, se inmunoprecipitaron 2 mg de un extracto de proteínas totales con la resina acoplada a anti-HA. Este inmunoprecipitado se incubó, durante 20 minutos a 30°C con 400 U de proteína fosfatasa del fago lambda (PPλ) (BioLabs) en el tampón suministrado con la enzima, antes del último lavado con tampón IP. A la vez, se incubó otra muestra con fosfatasa y con 10 mM de Vanadato sódico (un inhibidor de la proteína fosfatasa) como control negativo. Transcurrido ese tiempo se realizó el último lavado de la resina y las muestras se prepararon para su análisis mediante “Western blot”, añadiendo 20 µl de tampón de ruptura (ver apartado 3.4.5).

#### 3.6.4. Ensayos de inmunodetección de proteínas (“Western blot”).

Las muestras preparadas en tampón de ruptura TR (ver apartado 3.4.5) ó tampón de carga SB (ver apartado 3.5.4) se desnaturalizaron hirviéndolas durante 5 minutos. La separación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes según el protocolo de Laemmli<sup>171</sup>. El protocolo de “Western blot” utilizado fue el descrito por Orejas y colaboradores<sup>17</sup>. Las proteínas se revelaron en cada caso con el correspondiente anticuerpo primario y secundario conjugado a la peroxidasa y a las concentraciones que determina el fabricante. La actividad de la peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia

## MATERIALES y MÉTODOS

ECL plus (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante, y por exposición a películas Kodak X-OMAT.

### Anticuerpos utilizados:

- Anti-HA (3F10, rata): anticuerpo monoclonal de la casa Roche, contra un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus humano influenza. Dilución 1:1000
- Anti-Myc (9E10, ratón): anticuerpo monoclonal de la casa Santa Cruz biotechnology contra un epítipo que corresponde a los aminoácidos 408-439 del dominio C-terminal de la proteína humana c-Myc. Dilución 1:1000
- Anti-ubiquitina (P4D1, ratón): anticuerpo monoclonal de la casa Cell Signaling Technology contra ubiquitina. Dilución 1:1000
- Anti-PacC: anticuerpo policlonal de rata contra la región N-terminal de PacC (5-265). Dilución 1:2000
- Anti-rata (Southern Biotech): anticuerpo de cabra (IgM+ IgG) contra rata, acoplado a peroxidasa. Dilución 1:4000
- Anti ratón (Amersham Biosciences): anticuerpo de oveja contra ratón, acoplado a peroxidasa. Dilución 1:5000

### Inmunodetección de proteínas ubiquitinadas.

La inmunodetección de proteínas ubiquitinadas en inmunoprecipitados se realizó con el mismo protocolo, con la única diferencia de que después de la transferencia y antes del bloqueo con leche, la membrana se lavó en agua durante 5 minutos y se autoclavó durante 20 minutos a 121°C. La detección de la proteína se realizó con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ubiquitina (1:1000) y un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (1:5000).

### **3.6.5. Ensayos de unión *in vitro*.**

La expresión de proteínas fusionadas a GST se llevó a cabo en la cepa BL21 de *E. coli*, transformada con el plásmido de expresión adecuado. Las bacterias se cultivaron en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, a 37°C durante 16 horas. Se diluyó el cultivo 1/50 en un volumen final de 50 ml de LB con ampicilina y se incubó con agitación a 30°C hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,5 (1 hora y media). En ese momento, se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM y se incubó 2 horas con agitación a 30°C. Los cultivos se centrifugaron a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 7 ml de tampón STE (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM pH8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete) en la cantidad recomendada por el fabricante (Roche)). Después de añadir Triton X100 a una concentración final de 1%, las células fueron lisadas en una French Press, se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Se incubó 1 ml del sobrenadante con 100 µl de resina de Glutation-sefarosa (Amersham Biosciences) durante 1 hora en una rueda giratoria a 4°C. Previamente a su utilización, la resina fue lavada 5 veces con tampón STE+1% Triton. La resina incubada con el extracto se lavó 5 veces con 1 ml de tampón STE+1% Triton para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente a la resina.

Las proteínas sintetizadas *in vitro* fueron expresadas y marcadas con metionina [<sup>35</sup>S] (1,000 Ci/mmol) mediante el sistema TNT (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando para cada reacción 7,5 µl de una solución de plásmido preparada con el kit QIAprep® Spin Midiprep Kit (Qiagen).

A 20 µl de cada muestra precargada con proteína fusionada a GST, se le añadieron 5 µl del producto de expresión de TNT y se llevó hasta un volumen final de 0,5 ml con STE+1% Triton. Se incubaron las muestras durante 1 hora a 4°C en una rueda giratoria. Las proteínas no retenidas se eliminaron mediante 5 lavados con 1 ml de STE+1% Triton. En el cuarto lavado, cada muestra se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, para eliminar las proteínas adheridas a las paredes del tubo durante el proceso. Tras el último lavado, se eliminó completamente el sobrenadante y se resuspendió la resina en 20 µl de tampón de ruptura TR (ver apartado 3.4.5). Las proteínas se desnaturalizaron 5 minutos a 100°C y, tras una breve centrifugación, se cargaron 10 µl del sobrenadante. Las proteínas se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas totales presentes en el gel se visualizaron por tinción con Coomassie G250 (Biosafe Bio-Rad), y las proteínas marcadas con radioactividad se visualizaron exponiendo los geles secos a una película sensible a la radiactividad (Kodak) en presencia de una pantalla intensificadora (BioMax TranScreen-LE de Kodak).

### 3.7. “KITS” DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA UTILIZADOS EN ESTA TESIS.

Los ensayos realizados con los “kits” que a continuación se detallan fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes, con mínimas modificaciones.

**FastADN® Kit BIO101® Systems** (Q-BIOgene): se utilizó para la extracción de ADN genómico de *A. nidulans*.

**QIAquick® PCR Purification Kit** (Qiagen): se utilizó para la purificación de productos de PCR.

**QIAquick® Gel Extraction Kit** (Qiagen): se utilizó para la purificación de fragmentos de ADN procedentes de electroforesis en geles de agarosa.

**QIAprep® Spin Midiprep Kit** (Qiagen): se utilizó para la purificación de plásmidos procedentes de *E. coli* con alto grado de pureza y concentración.

**High Pure Plasmid Isolation Kit** (Roche): se utilizó para la purificación rutinaria de plásmidos procedentes de *E. coli*.

**TOPO TA Cloning® Versión P** (Invitrogen): Se utilizó para la clonación rápida de productos de PCR en el vector pCR2.1-TOPO mediante ligación por topoisomerasas.

**TNT Coupled Transcription-Translation System** (Promega): se utilizó para la síntesis *in vitro* de proteínas y su marcaje con metionina [<sup>35</sup>S] (1,000 Ci/mmol).

**Rediprime™ II Random Prime Labelling System** (Amersham Biosciences): se utilizó para el marcaje de fragmentos de ADN con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP que fueron posteriormente utilizados como sondas en ensayos de Southern-Blot.

**ProbeQuant™ G-50 Micro Columns** (Amersham Biosciences): se utilizó para la limpieza de las sondas marcadas radiactivamente con el kit anterior.

**ECL™ plus Western Blotting Detection Reagents** (Amersham Biosciences): se utilizó para la detección de anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano en ensayos de “Western blot”.



## **RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1. CONEXIÓN ENTRE LA MAQUINARIA ENDOCÍTICA ESCRT Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL EN *Aspergillus nidulans*.

Estudios previos revelaron una conexión entre la ruta de señalización por pH ambiental en hongos y la maquinaria endocítica ESCRT. En particular, resultados obtenidos en el laboratorio demostraron que uno de los componentes de esta ruta, PalA, interacciona en el sistema de doble-híbrido con Vps32, una proteína de la maquinaria ESCRT que se asocia de forma transitoria a la membrana del endosoma prevacuolar<sup>40,99</sup>. De forma similar, el análisis por doble-híbrido de las interacciones entre los distintos genes del genoma de *S. cerevisiae* demostró que el homólogo de PalA en este organismo, Rim20, interacciona también con Snf7 (Vps32)<sup>156</sup>. Sin embargo, la posible implicación de la maquinaria ESCRT en la transducción de la señal de pH no se había analizado al inicio de este estudio. Mutaciones en los genes correspondientes bloquean la maduración del endosoma prevacuolar a endosoma multivesicular (MVB) y producen la formación de un compartimento prevacuolar aberrante denominado "clase E". El primero de mis objetivos se centró en determinar si la ruta de señalización por pH ambiental está afectada en un mutante *vps* clase E.

#### 4.1.1. Caracterización de un mutante *vps* clase E en *Aspergillus nidulans*

Los primeros intentos en el laboratorio de interrumpir *vps32* con el marcador *argB* en una cepa haploide de *A. nidulans* no dieron resultados, sugiriendo que, a diferencia de lo que se observa en la levadura *S. cerevisiae*, este gen podría ser esencial en hongos filamentosos. En *S. cerevisiae*, Snf7 (Vps32) interacciona con Vps4 y con Rim20, el homólogo de PalA en la ruta de señalización por pH ambiental<sup>104</sup>. Vps4 es una proteína de la familia de las AAA ATPasas, necesaria para la disociación del complejo multiproteico ESCRT-III, que incluye Vps32<sup>99,109,110</sup>. Estudios previos en *S. cerevisiae* y en mamíferos demostraron que la sustitución en Vps4 de un residuo conservado de glutamato por glutamina, E233Q en *S. cerevisiae*<sup>110</sup> y E235Q en mamíferos<sup>172</sup>, inactiva la proteína, lo que bloquea la disociación del complejo multiproteico ESCRT-III. Este mutante se utilizó en varios estudios ya que la sobreexpresión de la proteína mutada actúa como dominante negativo y produce un efecto similar al observado en un mutante que carece de la proteína. Por esta razón, y dado la posibilidad de que los genes *vps* "clase E" sean esenciales en *A. nidulans*, decidimos analizar el efecto de este mutante dominante negativo sobre la ruta de señalización por pH ambiental. Nuestro primer objetivo fue estudiar el efecto de la expresión del alelo dominante negativo de *vps4* sobre el crecimiento del hongo en un medio de pH alcalino y sobre el procesamiento de PacC en respuesta a un incremento del pH ambiental.

Alineamientos múltiples de la secuencia de Vps4 en distintos organismos muestran que el residuo glutamato mutado en *S. cerevisiae* y mamíferos corresponde al residuo E232 en *A. nidulans* (Figura 13). Mediante mutagénesis dirigida, se construyó un plásmido que permitiera la expresión de Vps4E232Q bajo el control del promotor inducible *alcA<sup>P</sup>* (ver Materiales y Métodos).

## RESULTADOS

Anid	1	MSNTDFLGR	AITDVKK	KATIESD	NEGEY	EKAYQ	QYYSAL	ELFML	ALKWE	KNPKS	KEMIRAK	TGEYMD	RAEKLN	HLASQ	DSR	KKPSAV	GANGK	VSQSG
Scer	1	MSTGDFLT	KGIELV	QKAIDL	TATQY	EAYTAY	YNGLDY	LMLAL	KYE	KNPKS	KDLIRAK	FTEYLN	RAEQLK	HLESE	EANAA	KKSP	PSAGS	SGSNG
Spo	1	MSNPDC	LSKATIS	LKTAID	NDNRE	QYPDAY	KYQSA	LDYFM	ALKYE	KNEKS	KEIIR	SKVIEY	LDRAE	KLKYV	LQEKNN	Q	SSKS	RVSNG
Hsap	1	MSSTSP	NLQKAI	DLASKA	AAQED	KAGNYE	ALQLY	QHAWQY	FLHVY	EAQGD	KAKQ	SIRAK	CTEYLD	RAEKL	KEYL	KNKEK	KAAQ	KPVKEG
Anid	98	KGGKEDD	DNED	DSK	KLRSAL	AGAIL	SEKPN	VKWE	DVAGL	EGAKE	ALKEAV	ILPIK	FPHL	TGR	RQPNK	GILLY	GPPGT	GKSYL
Scer	98	KISQEEG	EDNGG	EDNK	LRGAL	SSAIL	SEKPN	VKWE	DVAGL	EGAKE	ALKEAV	ILPVK	FPHL	KGNR	KPTSG	ILLYG	PPGT	GKSYL
Spo	95	SNSPTAN	EALSD	AKLRS	ALTS	AILVE	KPNVR	DDI	AGLE	NAKE	ALKE	VLLP	IKLP	QLFS	HGRK	PWSG	ILLYG	PPGT
Hsap	100	NDSGDEG	ESDDP	EKR	KLQNL	QGAVI	DRPN	VKW	SDVAG	LEGAK	ALKEAV	ILPIK	FPHL	TGR	RT	PWRG	ILLYG	PPGT
Anid	196	VSSSDLV	SKWJGE	SERLV	KQLFN	MAREN	KPAI	IFIE	VDAL	CGARG	ENDE	SEASR	RIKTE	LLVQ	M	GVG	ND	SKG
Scer	197	VSSSDLV	SKWJGE	SEKLV	KQLF	MAREN	KPSI	IFIE	VDAL	TGR	GESE	ASRRI	KTE	LLVQ	M	GVG	ND	SKG
Spo	193	ISSSDLV	SKWJGE	SERLVR	QLFEM	AREK	PSI	IFIE	DSLC	SRSE	GESE	SSRRI	KTE	LLVQ	M	GVG	ND	SKG
Hsap	199	ISSSDLV	SKWJGE	SEKLV	KNLFL	QALRE	NKPSI	IFIE	DSLC	SRSE	NESE	AARRI	KTE	LLVQ	M	GVG	ND	SKG
Anid	296	SLPDIN	ARMK	MFML	AVG	STP	CHMT	QADY	RS	LAEQ	SEGY	SGSDI	STAV	QDAL	MQPI	RKI	QTATH	YK
Scer	297	PLPDLA	ARTT	MF	AVG	STP	CHMT	QADY	RS	LAEQ	SEGY	SGSDI	STAV	QDAL	MQPI	RKI	QTATH	YK
Spo	293	PLPNAH	ARARM	FELN	VGKIP	SELT	SQDF	KELAK	MTD	GYSG	SDI	SIVV	RD	AIM	PVRR	IHTA	THF	K
Hsap	299	PLPNAH	ARARM	FELN	VGKIP	SELT	SQDF	KELAK	MTD	GYSG	SDI	SIVV	RD	AIM	PVRR	IHTA	THF	K
Anid	388	TEADQL	LEPL	VLKD	FIKAI	RNSR	PTV	SQED	L	KRNA	ENTQ	EFG	SEGA	434				
Scer	391	TEADEL	KEPDL	TIKD	FLKAI	KSTR	PTV	NEDDL	K	QEQF	TRDF	GQEG	437					
Spo	387	VNPEDIM	EPLTV	RDFYS	AVR	KVKPT	LNAG	DIKHT	Q	TKDF	GAE	432						
Hsap	399	VPGKLL	EPVVS	MSD	M	LRSL	SNTK	PTV	N	EDLL	KLKF	E	DFG	444				

\* Residuo sustituido en *A. nidulans*: Vps4E232Q

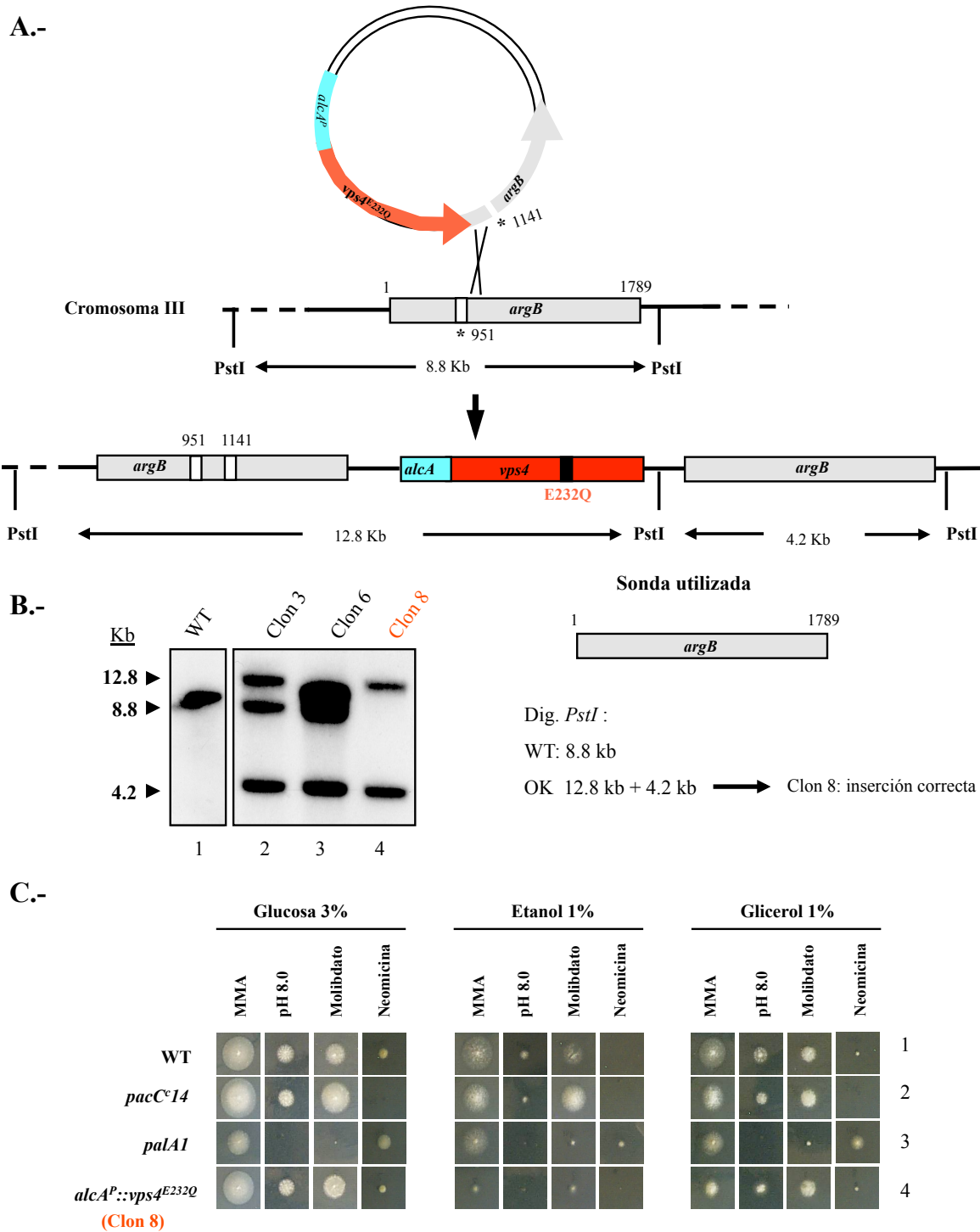
**Figura 13. Alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica de Vps4 en distintos organismos.** El residuo de glutamato altamente conservado (E232 en *A. nidulans*) sustituido por un residuo Glutamina en el mutante dominante negativo, está enmarcado en rojo. En azul claro se muestran los residuos totalmente conservados, en azul oscuro los residuos con grado de conservación elevado y en gris los que tienen un grado de conservación medio. Anid, *Aspergillus nidulans*, Scer, *Saccharomyces cerevisiae*, Spo, *Saccharomyces pombe*, Hsap, *Homo sapiens*.

### 4.1.1.1. Construcción de una cepa que expresa de forma condicional Vps4<sup>E232Q</sup>.

Se construyó un plásmido, como se detalla en la sección 3.3.1. de Materiales y Métodos, que contiene *vps4* bajo el control del promotor *alcA<sup>P</sup>*, seguido del gen *argB* con una mutación en el nucleótido 1141. Se transformó con este plásmido la cepa MAD1167 (ver tabla 2), cuyo gen *argB* tiene una mutación en el nucleótido 951 (*argB2*, mutación distinta pero muy cercana a la mutación anterior). La reparación del gen *argB* mediante recombinación homóloga se seleccionó en un medio sin L-arginina (ver apartado 3.4.4.3 de Materiales y Métodos). Se consiguió de esta forma integrar en el locus *argB* del cromosoma III de esta cepa, la construcción que permite la expresión de Vps4<sup>E232Q</sup> bajo el control del promotor inducible por etanol *alcA<sup>P</sup>* (Figura 14A).

Los transformantes obtenidos se purificaron en medio sólido sin L-arginina, y se comprobó mediante “Southern-blot” la correcta integración del plásmido digiriendo con PstI el ADN genómico de los clones seleccionados (Figura 14B). Como se observa en el carril 1 de la Figura 14B, la digestión con PstI del ADN de la cepa receptora reveló una sola banda de 8.8 kb, mientras que, en el caso de la cepa que contiene una única integración del plásmido, se detectaron dos bandas de 12.8 y 4.2 Kb (carril 4). En este mismo ensayo se obtuvieron dos transformantes con un proceso de doble integración (carriles 2 y 3). Estas bandas se revelaron por hibridación con una sonda radiactiva constituida por un fragmento del gen *argB* amplificado por PCR con los oligonucleótidos OV135 y OV136 (Tabla 4 de Materiales y Métodos). Se obtuvo de esta forma una cepa que permitía la expresión condicional de Vps4<sup>E232Q</sup> bajo el control del promotor inducible por etanol *alcA<sup>P</sup>*.





**Figura 14. Integración genómica de *alcA*<sup>P</sup>::*vps4*<sup>E232Q</sup> y análisis fenotípico.** A) Esquema de la integración de *alcA*<sup>P</sup>::*vps4*<sup>E232Q</sup> en el locus *argB* y de los fragmentos de ADN genómico generados mediante una digestión con la enzima *PstI* del ADN total del transformante. Se indica el tamaño de los fragmentos teóricos de ADN en kb. El gen *vps4* se muestra en rojo, el promotor *alcA*<sup>P</sup> en azul, el gen *argB* en gris, ambas mutaciones en el gen *argB* en blanco y la mutación en *vps4* en negro. B) Ensayo de “Southern-blot”. Los tamaños de las bandas se indican en kb. C) Análisis fenotípico en medio sólido de la cepa generada (fila 4) junto a una cepa silvestre (fila 1), una cepa mutante *pacC* constitutivo (*pacC*<sup>14</sup> fila 2) y un mutante de pérdida de función de la ruta *pal* (*palA1* fila 3). Se muestra el crecimiento en placas de MMA suplementadas con tres fuentes de carbono distintas, 3% de glucosa (p/v), 1% de etanol (v/v) o 3% de glicerol (p/v), 5 mM de tartrato amónico y los suplementos adecuados. Los medios diagnósticos de pH 8.0, Neomicina y Molibdato se describen en la sección 3.4.2 de Materiales y Métodos.

## RESULTADOS

### 4.1.1.2. Análisis fenotípico de una cepa que expresa Vps4<sup>E232Q</sup>

En la Figura 14C, analizamos el crecimiento en MMA con 3 fuentes de carbono distintas, del transformante seleccionado (fila 4) junto a una cepa silvestre (fila 1), un mutante de pérdida de función de la ruta de señalización por pH ambiental (*palA1*: fila 3) y un mutante con la ruta activada de forma constitutiva (*pacC<sup>14</sup>*: fila 2). El crecimiento de estas cepas se analizó en medios diagnósticos para comprobar el correcto funcionamiento de la ruta de señalización por pH ambiental: a pH alcalino (pH 8), en presencia de Molibdato o en presencia de Neomicina. De acuerdo con resultados ya publicados, la cepa con un alelo constitutivo de *pacC* (fila 2) es hiper-resistente a Molibdato e hiper-sensible a Neomicina, al contrario de lo que se observa en el caso de una cepa mutante en un gen *pal* (fila 3).

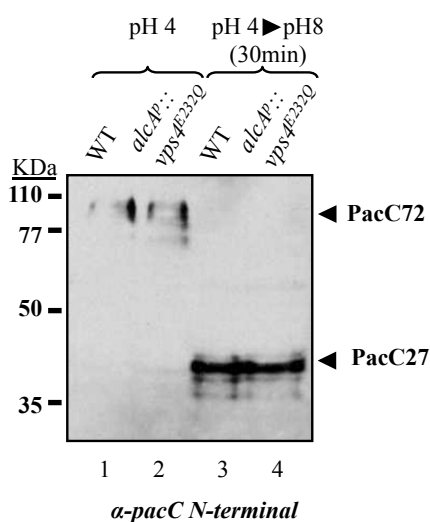
El transformante seleccionado (clon 8, fila 4) presenta un comportamiento silvestre cuando el promotor *alcA<sup>P</sup>* está reprimido en medio mínimo con Glucosa 3%, como se puede observar en la Figura 14C. Este fenotipo cambia radicalmente al inducir el promotor *alcA<sup>P</sup>* con etanol (MMA, etanol 1%). La cepa que expresa Vps4<sup>E232Q</sup> no crece en ninguno de los medios probados cuando la fuente de carbono es etanol 1%, lo que indica que en estas condiciones, la sobreexpresión de Vps4<sup>E232Q</sup> es letal (Figura 14C). Dado que la inducción de *alcA<sup>P</sup>* es mucho menor cuando se utiliza glicerol 3% como fuente de carbono, el fenotipo del transformante seleccionado también se analizó en estas condiciones. Comprobamos en este último medio que el transformante seleccionado crece de una forma similar a la cepa silvestre (fila 1) y que no presenta un fenotipo asociado a la pérdida de función de la ruta de señalización por pH ambiental (hiper-sensibilidad a Molibdato e hiper-resistencia a Neomicina) (fila 3).

### 4.1.1.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Vps4<sup>E232Q</sup> sobre el procesamiento de PacC en respuesta a un cambio de pH.

Para investigar el posible efecto de la sobreexpresión de Vps4<sup>E232Q</sup> sobre la ruta de señalización por pH ambiental, se analizó el procesamiento proteolítico de la proteína PacC mediante “Western-blot”. El transformante seleccionado se cultivó, junto a una cepa silvestre, en medio completo ácido (pH 4), con glucosa como fuente de carbono. En estas condiciones, la ruta *pal* no está activa (PacC no está procesado), y el promotor *alcA<sup>P</sup>* no está inducido. Se pasó el micelio a un medio completo ácido (pH 4) con etanol 1% como fuente de carbono, para inducir el promotor *alcA<sup>P</sup>*, y se cultivó durante 6 horas más. Se recogió parte de este micelio y se prepararon extractos proteicos. Como podemos ver en los carriles 1 y 2 de la Figura 15, PacC se encuentra en su forma no procesada en ambas cepas (silvestre y mutante) ya que el medio es ácido. El resto del micelio se pasó a un medio igual que el anterior (1% etanol) pero a pH 8 para activar la ruta de señalización por pH ambiental. Después de 30 minutos, se recogió también este micelio y se prepararon extractos proteicos. Como se puede observar en la Figura 15 (carriles 3 y 4), PacC se procesa en respuesta al cambio de pH en ambas cepas, en condiciones en las cuales Vps4<sup>E232Q</sup> está sobreexpresado.

El resultado de estos experimentos sugiere, por lo tanto, que la función de Vps4 no es necesaria para activar la ruta de señalización por pH ambiental en *A. nidulans*. Sin embargo, estos resultados no permiten descartar la posibilidad de que la inactivación de otros genes *vps* clase E tengan un efecto sobre esta ruta de señalización. Por otra parte, los test fenotípicos realizados sugieren que los mutantes *vps* clase E no son viables en *A. nidulans*, a diferencia de lo que se había observado en *S. cerevisiae*. Dada la dificultad de realizar este

estudio mediante abordajes genéticos, decidimos investigar la conexión entre la maquinaria ESCRT y la ruta de señalización por pH ambiental mediante la caracterización molecular de la interacción entre Vps32 y PalA.



**Figura 15. Análisis del efecto de la sobreexpresión de Vps4<sup>E232Q</sup> sobre el procesamiento de PacC.** Análisis mediante “Western-blot” de PacC con un anticuerpo policlonal contra la región N-terminal de PacC en un gel de poliacrilamida del 7.5%. Los extractos proteicos totales (50µg) provienen de una cepa silvestre (WT) ó de una cepa con *alcA<sup>P</sup>::vps4<sup>E232Q</sup>* integrado, ambas cultivadas en un medio de pH ácido (pH 4) con glucosa como fuente de carbono y pasadas al mismo medio con etanol durante 6 horas para inducir *alcA<sup>P</sup>*, antes (carril 1 y 2) ó después (carril 3 y 4) de un cambio de pH ácido (pH 4) a pH alcalino (pH 8) durante 30 minutos. Los tamaños de las bandas se indican en kDa.

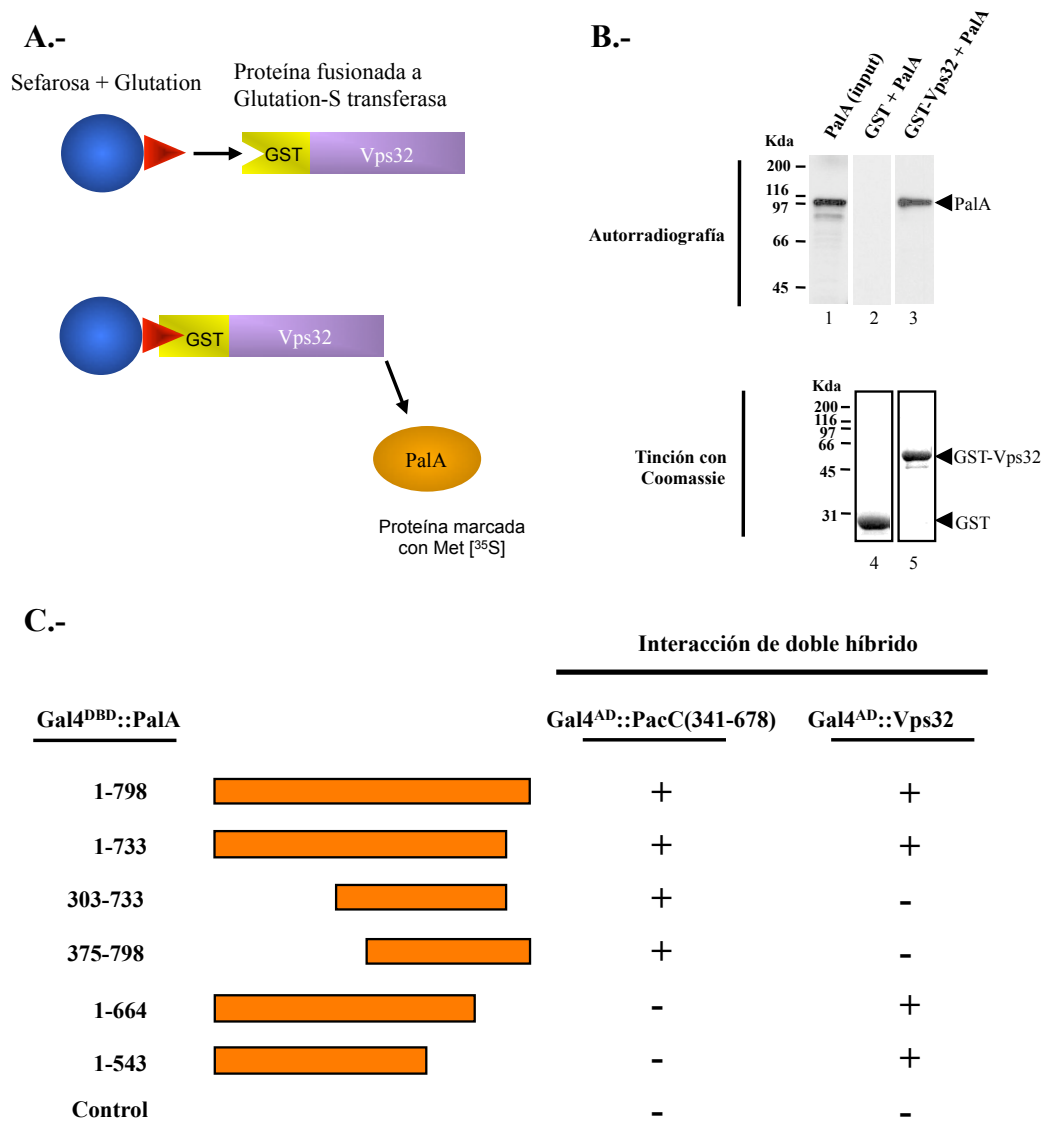
#### 4.1.2. Caracterización de la interacción entre PalA y Vps32.

Estudios previos del laboratorio demostraron mediante ensayos de doble-híbrido que PalA interactúa con Vps32, una proteína de la maquinaria endocítica ESCRT<sup>40</sup>. Estudios realizados en *S. cerevisiae* también permitieron detectar esta interacción entre Rim20 y Snf7, los homólogos de PalA y Vps32 en este organismo<sup>104</sup>. Sin embargo, al iniciar este estudio, se desconocía si estas interacciones eran directas, y siendo así, cual era la región de PalA implicada en la interacción con Vps32. Nuestro siguiente objetivo fue caracterizar esta interacción, para lo cual llevamos a cabo los siguientes experimentos de unión *in vitro* y mapeo por doble-híbrido.

##### 4.1.2.1. La interacción entre PalA y Vps32 es directa.

Para determinar si la interacción entre estas dos proteínas es directa, se realizó un ensayo de unión *in vitro* con proteínas expresadas en bacteria y purificadas ó sintetizadas *in vitro*. Tal y como se describe en el esquema de la Figura 16A, la proteína Vps32 se expresó en *E. coli* como fusión a Glutación S-transferasa, lo que permitió su purificación mediante la unión a una resina de Glutación-sefarosa. La resina precargada con GST-Vps32 se incubó con PalA expresado *in vitro* mediante el sistema de expresión TNT (Promega) y marcado con Metionina [<sup>35</sup>S] (sección 3.6.5 de Materiales y Métodos). Después de varios lavados en presencia de 0.1% triton, las proteínas retenidas por la resina se extrajeron con tampón de carga SDS-PAGE. Las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida, exponiéndose posteriormente a películas sensibles a la radiación. En la Figura 16B, se observa el resultado del ensayo de unión *in vitro* donde podemos ver, en la parte superior, la exposición de la autorradiografía y, en la parte inferior, la tinción con Coomassie del gel, en el que se observan las proteínas GST y GST-Vps32 cargadas en el ensayo. En el carril 3 de esta Figura observamos que PalA queda retenida con GST-Vps32, lo que indica que estas 2 proteínas interactúan de forma directa. Esta interacción es específica ya que en el carril 2 no se observa ninguna banda cuando se incubó GST sólo con la proteína marcada. En el carril 1 se muestra el control de carga de la proteína PalA marcada con Metionina [<sup>35</sup>S], que corresponde al 10% de lo

## RESULTADOS



**Figura 16. Interacción entre las proteínas PalA y Vps32 de *A. nidulans* y mapeo de las regiones interactivas de PalA.** A) Esquema de cómo se lleva a cabo el ensayo de unión *in vitro*. B) Análisis de la unión *in vitro* entre las proteínas PalA y Vps32. Se incubaron PalA sintetizado *in vitro* en el sistema de TNT y marcado con metionina [<sup>35</sup>S] con GST ó GST-Vps32 purificados de extractos bacterianos y unidos a perlas de glutatión-Sepharosa. Después de lavados, las proteínas que quedan unidas a la resina de glutatión-Sepharosa se resolvieron en geles SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron mediante autorradiografía (PalA marcado) ó tinción con Coomassie (fusiones a GST). Los “inputs” representan un 10% de la proteína marcada empleada en los ensayos. C) Mapeo por doble-híbrido: esquema de los fragmentos de PalA fusionados a Gal4<sup>DBD</sup> (dominio unión de Gal4) que interaccionan con fusiones de un fragmento de PacC (341-678) y de Vps32 al dominio de activación de Gal4 (Gal4<sup>AD</sup>).

que se utilizó en el ensayo de interacción *in vitro*. Por lo tanto, alrededor del 10% de la proteína PalA añadida queda retenida por la resina, lo que indica que la interacción entre PalA y Vps32 es medianamente fuerte.

### 4.1.2.2. Mapeo por doble-híbrido de las regiones interactivas de PalA.

Datos previos de nuestro laboratorio indican que PalA interacciona a través de su región C-terminal con los motivos YPXL/I en PacC y que esta interacción es independiente de la conformación de PacC, lo que indica

que esta región está expuesta en cualquiera de las 3 formas en las que se encuentra PacC (PacC<sup>72</sup>, PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup>)<sup>40</sup>. Nuestros resultados, por otra parte, indican que PalA interacciona directamente con Vps32. Nuestro siguiente objetivo fue identificar la región de la proteína PalA que interacciona con Vps32, para lo cual se realizó un mapeo por doble-híbrido con distintos fragmentos de PalA.

Los fragmentos de PalA se expresaron fusionados al dominio de unión a ADN de Gal4 (Gal4<sup>DBD</sup>) (sección 3.3.3 de Materiales y Métodos) y se ensayó su interacción frente a una fusión de la proteína Vps32 al dominio activador de Gal4 (Gal4<sup>AD</sup>). Los resultados obtenidos confirman la interacción de la región C-terminal de PalA (375-733) con PacC, como se comentó anteriormente (Figura 16C). Por otra parte, los resultados obtenidos demuestran que la parte N-terminal de PalA (1-302) es necesaria para la interacción con Vps32, mientras que la parte C-terminal (544-798) de la proteína no lo es.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que Vps32 y PalA interaccionan de forma directa y específica y que esta interacción implica la región N-terminal de PalA correspondiente al dominio Bro1. PalA actúa como una proteína andamio que interacciona con Vps32 mediante su región N-terminal y con PacC mediante su región C-terminal.

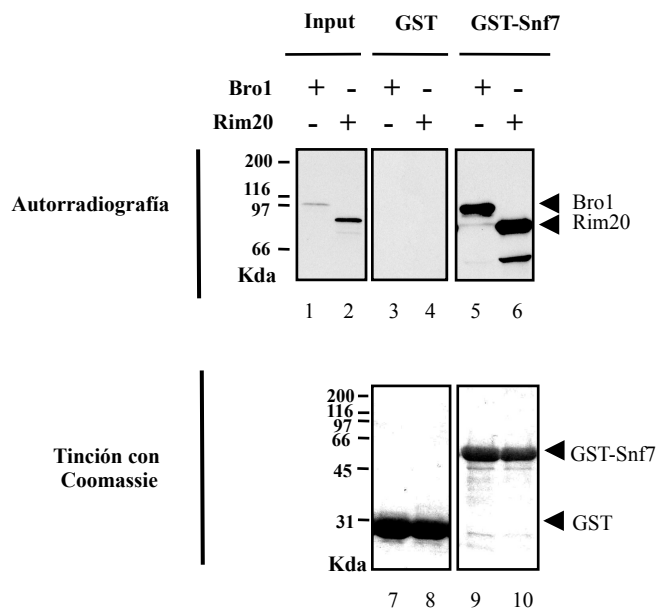
#### 4.1.2.3. Interacción entre proteínas con dominio Bro1 y homólogos de Vps32 en otros organismos.

La implicación de la región N-terminal de PalA, correspondiente al dominio Bro1, en la interacción con Vps32 nos llevo a investigar la posible unión directa de proteínas con dominio Bro1 con homólogos de Vps32 en otros organismos.

- *Saccharomyces cerevisiae*: La ruta de señalización por pH ambiental está muy conservada en hongos. Estudios previos de doble-híbrido ya detectaron la interacción del homólogo de PalA, Rim20, con Snf7 (Vps32), como ya hemos comentado anteriormente, además de la interacción de Snf7 con Rim13 (homólogo de PalB). Así mismo se postuló que Snf7 actúa como proteína andamio entre el complejo formado por Rim20 y el factor de transcripción Rim101, y la cisteína proteasa Rim13, supuestamente responsable de la activación mediante procesamiento proteolítico de Rim101<sup>55</sup>. Rim20 contiene un dominio Bro1 presente también en la proteína Bro1, implicada en endocitosis en *S. cerevisiae*.

Nuestro objetivo fue determinar si Bro1 y Rim20, al igual que PalA, interaccionan directamente con Snf7 en ensayos de unión *in vitro*. Para llevar a cabo este experimento, se expresó Snf7 fusionado a Glutathion-S transferasa en *E. coli* y se sintetizaron Rim20 y Bro1 en el sistema de expresión *in vitro* TNT mediante marcaje con Metionina [<sup>35</sup>S]. En la parte derecha del panel de la Figura 17, se muestra el resultado del ensayo de unión; en la parte superior, vemos la exposición de la autorradiografía y, en la parte inferior, la tinción con Coomassie del gel en el que se observan las proteínas GST y GST-Snf7 cargadas en el ensayo. En los carriles 5 y 6, se puede observar que las proteínas Bro1 y Rim20 interaccionan con GST-Snf7 de forma directa. Esta interacción es específica ya que en los carriles 3 y 4 no se observa banda alguna cuando se incubó GST sólo con las proteínas marcadas. En la parte izquierda del panel (carriles 1 y 2) se muestran los controles de carga de ambas proteínas Rim20 y Bro1 marcadas con Metionina [<sup>35</sup>S]. Como conclusión, podemos decir que ambas proteínas, Rim20 y Bro1, interaccionan de forma directa y específica con Snf7 y por lo tanto la interacción entre proteínas con dominio Bro1 y Snf7/Vps32 está conservada en *S. cerevisiae* y *A. nidulans*.

## RESULTADOS

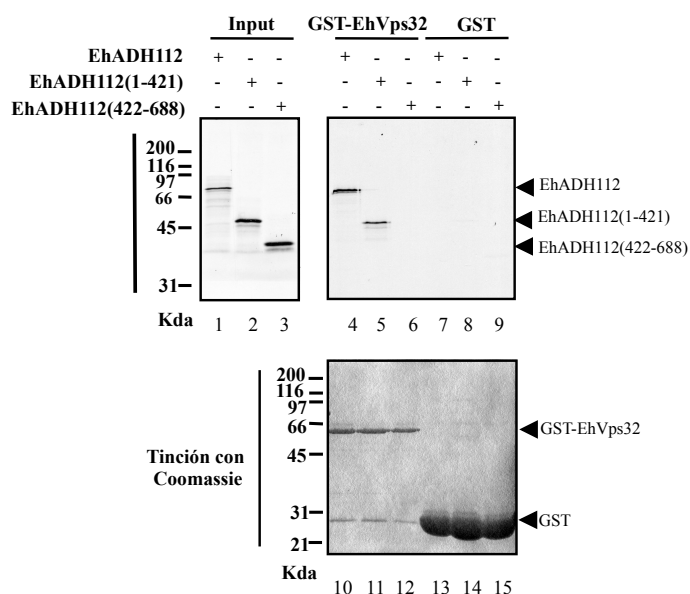


**Figura 17. Unión de Rim20 y Bro1 con Snf7 en *S. cerevisiae*.** Análisis de la unión *in vitro* de las proteínas Bro1 y Rim20 con Snf7. Se incubaron Bro1 y Rim20 sintetizados *in vitro* en el sistema de TNT y marcado con metionina [<sup>35</sup>S] con GST ó GST-Snf7 purificados de extractos bacterianos y unidos a perlas de glutatión-Sepharosa. Después de lavados, las proteínas que quedan unidas a la resina de glutatión-Sepharosa se resolvieron en geles SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron mediante autorradiografía (Bro1 y Rim20 marcados) ó tinción con Coomassie (fusiones a GST). Los “inputs” representan un 10% de la proteína marcada empleada en los ensayos.

• *Entamoeba histolytica*: Estudios del laboratorio de E. Orozco han demostrado que EhADH112 es una adhesina que contiene un dominio conservado Bro1 en la región N-terminal y que juega un papel esencial en la fagocitosis en *E. histolytica*. EhADH112 forma un complejo llamado CPADH, junto a una cisteína proteasa perteneciente a la familia de las catepsinas (EhCP112). Esta asociación entre una proteína con dominio Bro1 y una cisteína proteasa resulta muy llamativa dada la similitud existente con la asociación funcional de PalA, con dominio Bro1, con la cisteína proteasa PalB en el sistema de regulación por pH ambiental en *A. nidulans*. Dado que PalA une directamente Vps32, decidimos averiguar si EhADH112 interacciona con el homólogo de Vps32 en *E. histolytica*. Después de identificar EhVps32 mediante comparación de secuencia, se expresó esta proteína fusionada a Glutacion-S-transferasa en *E. coli* y EhADH112 se sintetizó en el sistema de expresión *in vitro* TNT mediante marcaje con Metionina [<sup>35</sup>S]. En la parte derecha del panel de la Figura 18 se muestra el resultado del ensayo de unión. Podemos ver, en la parte superior, la exposición de la autorradiografía y, en la parte inferior, la tinción con Coomassie del gel en el que se observan las proteínas GST y GST-EhVps32 cargadas en el ensayo. En el carril 4 demostramos que existe una interacción entre ambas proteínas y que ésta es directa. Esta interacción es específica ya que en el carril 7 no se observa banda alguna cuando incubamos GST sólo con la proteína marcada. Ampliamos el estudio mapeando la región de unión de EhADH112 a EhVps32. Para ello, se construyeron los plásmidos permitiendo la expresión de las regiones N y C-terminal de la proteína EhADH112, como se detalla en la sección 3.3.2 de Materiales y Métodos. A continuación, EhADH112(1-421) (mitad N-terminal) y EhADH112(422-688) (mitad C-terminal) se sintetizaron en el sistema de expresión *in vitro* TNT. Como se observa en la Figura 18, EhVps32 interacciona con la región N-terminal de EhADH112(1-421). En la parte izquierda del panel (carriles 1-3) se muestran los controles de carga de las proteínas marcadas con Metionina [<sup>35</sup>S].

Podemos concluir, por lo tanto, que la interacción entre EhVps32 y EhADH112 es directa y específica, y que está mediada por la región N-terminal de la proteína EhADH112, correspondiente al dominio Bro1. El conjunto de estos resultados demuestran, por una parte, que la interacción entre homólogos de Vps32 y proteínas

con dominio Bro1 está conservada en distintos organismos y revelan, por otra parte, una conexión entre la adhesina EhADH112 y la maquinaria ESCRT en *E. histolytica*.

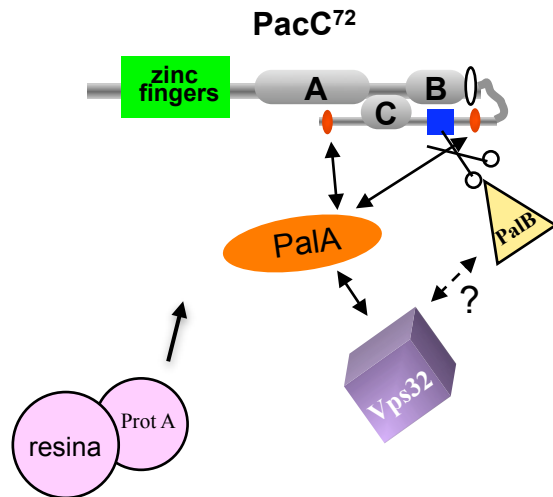


**Figura 18. Interacción entre EhVps32 y EhADH112 de *E. histolytica*.** Análisis de la unión *in vitro* de EhVps32 con EhADH112 (proteína con dominio Bro1) y con los fragmentos EhADH112(1-421) y EhADH112(422-688) de dicha proteína. Se incubaron EhADH112 y los fragmentos correspondientes sintetizados *in vitro* en el sistema de TNT y marcado con metionina [<sup>35</sup>S] con GST ó GST-EhVps32 purificados de extractos bacterianos y unidos a perlas de glutatión-Sepharosa. Después de lavados, las proteínas que quedan unidas a la resina de glutatión-Sepharosa se resolvieron en geles SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron mediante autoradiografía (EhADH112 y derivados truncados marcados) ó tinción con Coomassie (fusiones a GST). Los “inputs” representan un 10% de la proteína marcada empleada en los ensayos.

#### 4.1.3. Estudio de la interacción de PalA con otras proteínas de la ruta de señalización por pH ambiental.

Una vez analizada la conexión entre la ruta de señalización por pH ambiental y la maquinaria ESCRT, a través de la interacción directa entre Vps32 y la región N-terminal de PalA en *A. nidulans*, nuestro siguiente objetivo fue analizar la interacción de PalA con otras proteínas de la ruta de *pal*. Como se comentó en la introducción, estudios mediante ensayos de doble-híbrido y de unión *in vitro* demostraron que la región C-terminal de PalA interacciona con la parte C-terminal del factor de transcripción PacC. Esta interacción ha sido también detectada entre los homólogos de estas proteínas en *S. cerevisiae* donde, por otra parte, se ha detectado una interacción entre el homólogo de PalB, Rim13 y Snf7 (Vps32) en el sistema de doble-híbrido. Aunque no hemos podido detectar esta segunda interacción en *A. nidulans*, estos datos sugieren que PalA, PalB y PacC forman un complejo necesario para el corte proteolítico de PacC, supuestamente por la cisteína proteasa PalB.

Con todos estos datos, nuestro cometido en este momento se centró en la detección de estas interacciones *in vivo*. Este estudio se llevó a cabo mediante ensayos de coimmunoprecipitación, con lo cual tuvimos que etiquetar previamente PalA con tres copias del epítipo MYC e integrar la construcción correspondiente en el locus *palA* de una cepa receptora. Posteriormente, se cruzó la cepa obtenida con otra cepa expresando PalB etiquetado con tres copias del epítipo HA, obteniendo una cepa que expresaba ambas proteínas etiquetadas. Así, utilizando una resina de sefarosa acoplada a proteína A (GE Healthcare, ver sección 3.6.2 de Materiales y Métodos), podríamos inmunoprecipitar la proteína PalA::3MYC, previamente incubada con el anticuerpo anti-MYC, y comprobar si PacC, PalB::3HA, o ambas inmunoprecipitan junto con PalA::3MYC, como se muestra en el esquema de la Figura 19. Podríamos así determinar en un mismo experimento, con los anticuerpos correspondientes (anti-MYC y anti-HA y anti-PacC), si estas proteínas interaccionan con PalA ya sea de forma directa o indirectamente a través de Vps32 como se postuló en *S. cerevisiae*<sup>55</sup>.



**Figura 19. Esquema del modelo de interacción propuesto entre las proteínas PalA, PalB y PacC.** La resina sefarosa unida a proteína A (en rosa) interactúa a través del anticuerpo anti-MYC con PalA::3MYC (naranja). PalB::3HA se muestra en amarillo y Vps32 en morado. PacC se muestra en gris en su conformación cerrada (PacC<sup>72</sup>), con los dos sitios de interacción de PalA en rojo y el lugar de corte de la putativa cisteína proteasa PalB en azul. Las flechas dobles indican las interacciones detectadas *in vitro* y/o en el sistema de doble-híbrido y la flecha doble discontinua una interacción detectada mediante el sistema de doble-híbrido en *S. cerevisiae* aunque no en *A. nidulans*.

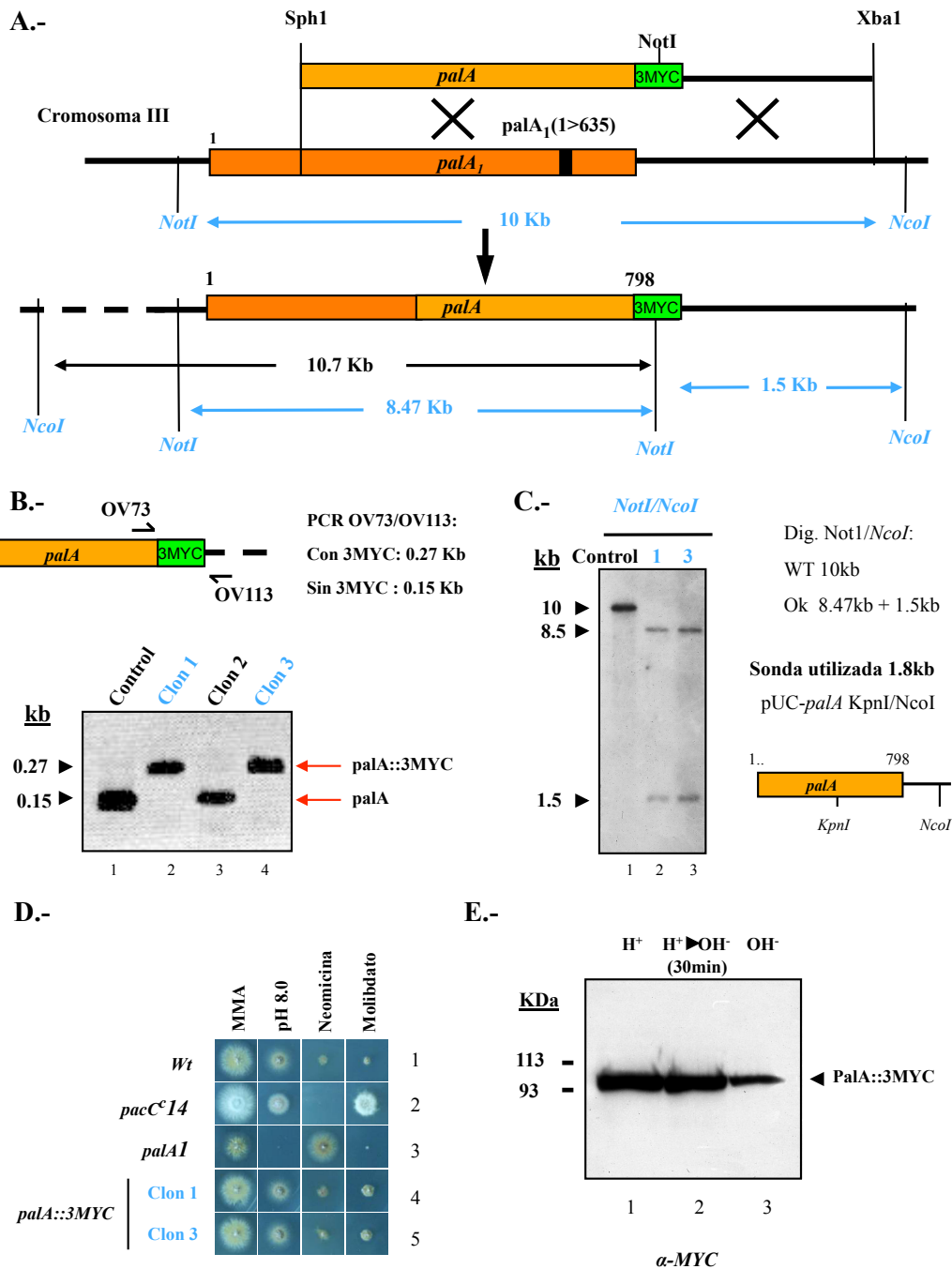
#### 4.1.3.1. Construcción de una cepa que expresa PalA::3MYC.

Para la obtención de la cepa que expresa PalA::3MYC, se construyó en primer lugar un plásmido con un fragmento de *pala* etiquetado con 3 copias del epítipo MYC, como se detalla en la sección 3.4.4.1 de Materiales y Métodos. Este epítipo se introdujo en el extremo C-terminal de *pala*, en un sitio *NotI* creado mediante mutagénesis dirigida (sección 3.3.1 Materiales y Métodos). Esta es una región con mucha variabilidad entre los homólogos de PalA, lo que sugiere que la introducción de este epítipo no debería afectar la función de la proteína (se intentó introducir el epítipo en el extremo N-terminal en primer lugar pero no se obtuvieron transformantes). El plásmido obtenido se digirió con *SphI* y *XhoI* para extraer el fragmento de *pala* conteniendo las tres copias del epítipo MYC (Figura 20A). Este fragmento se utilizó para transformar una cepa con una mutación de pérdida de función en *pala* (MAD341, ver Materiales y Métodos), buscando la integración de este fragmento en el locus *pala* mediante un suceso de doble recombinación homóloga en la secuencia codificante y el terminador (Figura 20A). Los transformantes obtenidos fueron analizados en primer lugar mediante PCR (Figura 20B), utilizando los oligonucleótidos OV73 y OV113 que amplifican una pequeña región de *pala* donde se encuentra el epítipo. Se observa una banda de 0.27 kb si se ha integrado *pala* etiquetado con 3MYC (carril 2 y 4), mientras que si no ha habido integración, la banda es de 0.15 kb (carril 1 y 3).

En la Figura 20B, podemos ver que los clones 1 y 3 tienen integrado *pala::3MYC* ya que el producto de PCR migra 120 pares de bases por encima del obtenido con la cepa receptora (control). Mediante análisis fenotípico en placa (Figura 20D), comprobamos que las cepas preseleccionadas por PCR (filas 4 y 5) son completamente funcionales ya que el crecimiento en los distintos medios diagnósticos es igual que el de una cepa silvestre (fila 1). Se muestra el crecimiento en placas de MMA suplementadas con 3% (p/v) de glucosa como fuente de carbono, 5 mM de tartrato amónico como fuente de amonio y los suplementos adecuados. Los medios diagnósticos (pH 8.0, Neomicina y Molibdato) se describen en la sección 3.4.2 de Materiales y Métodos.

A continuación, se analizaron mediante “Southern-blot” las cepas preseleccionadas (clones 1 y 3) para comprobar la presencia de una única copia etiquetada de *pala* integrada en su locus. Se digirió el ADN genómico de la cepa receptora y el de ambos transformantes con *NotI* y *NcoI*, lo que debería dar lugar, en el caso de una integración simple, a dos bandas de 8.5 kb y 1.5 kb y en el caso de la cepa receptora utilizada como control negativo, a una banda de 10 kb.





**Figura 20. Etiquetado de PalA con el triple epítipo MYC y comprobación del fenotipo silvestre de la cepa obtenida. A)** Esquema del reemplazamiento génico de *palA* por *palA::3MYC* y de los fragmentos de ADN genómico generados mediante una digestión con las enzimas *NcoI* y *NotI* del ADN total del transformante. En la parte inferior del dibujo, se indica el tamaño (en kb) de los fragmentos teóricos de ADN de la cepa obtenida (en azul) y en negro los fragmentos teóricos de ADN de la cepa receptora. *palA1* se muestra en naranja, el fragmento de *palA* etiquetado con triple MYC se muestra en naranja claro, el epítipo MYC en verde, y la mutación en *palA1* en negro. **B)** Análisis por PCR de tres transformantes obtenidos junto con la cepa receptora (control), utilizando los oligonucleótidos OV73 y OV113. **C)** Ensayo de "Southern-blot" de los dos transformantes preseleccionados (carriles 2 y 3) junto a la cepa receptora (control, carril 1). Se muestra el resultado de la hibridación con una sonda radiactiva creada con un fragmento del gen *palA* de 1.8kb amplificado por PCR y digerido con *kpnI* y *NcoI*. Los tamaños de las bandas se indican en kb. **D)** Análisis fenotípico en placa de los 2 clones preseleccionados por PCR (filas 4 y 5) junto a una cepa silvestre (fila 1), un mutante en *pacC* constitutivo (*pacC<sup>14</sup>* fila 2) y un mutante en la ruta *pal* (*palA1* fila 3). **E)** Análisis mediante "Western-blot" con un anticuerpo monoclonal contra el epítipo MYC de *PalA::3MYC*. Los extractos proteicos totales (50µg) provienen de micelio cultivado en un medio de pH ácido (carril 1), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carril 2) ó cultivado en un medio de pH alcalino (carril 3).

## RESULTADOS

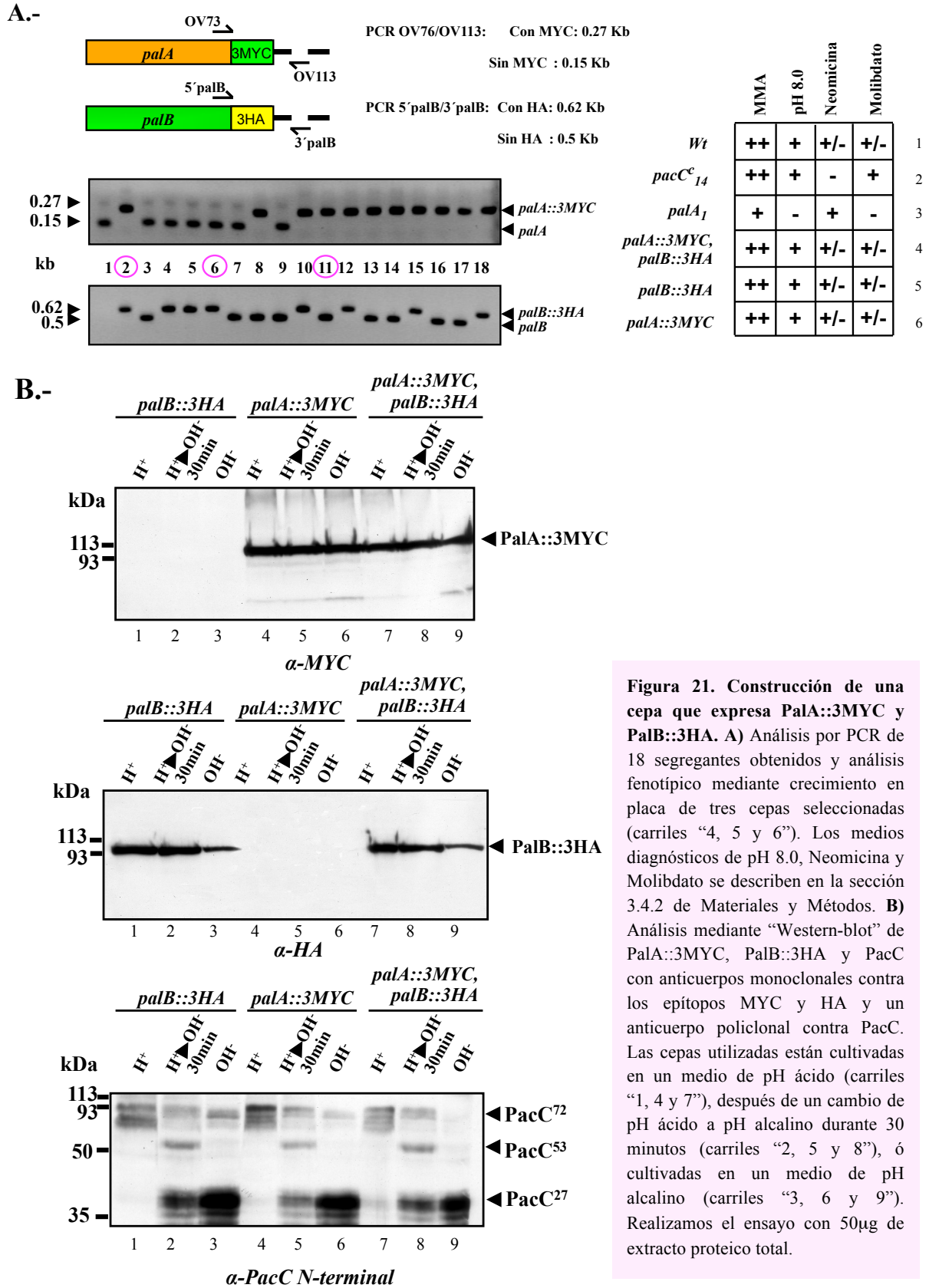
En el carril 1 de la Figura 20C en el que se analiza la cepa receptora, observamos cómo efectivamente obtenemos una banda de 10 kb mientras que ambos clones revelan 2 bandas de 8.5 y 1.5, lo que demuestra que ambos transformantes contienen una integración simple de la construcción. Como sonda se utilizó un fragmento de *palA* obtenido mediante digestión con *KpnI* y *NcoI*.

Se confirmó así que ambos clones son positivos y se seleccionó el clon 1 para analizar la proteína etiquetada mediante un ensayo de “Western-blot” (Figura 20E). Para llevar a cabo este ensayo, se creció la cepa en distintos medios de cultivo: en medio de pH ácido (carril 1) y en medio de pH alcalino ya sea después de un cambio de pH durante 30 minutos (carril 2) o en crecimiento continuo a pH alcalino (carril 3). Los extractos de proteína preparados en las distintas condiciones (ver sección 3.4.5 de Materiales y Métodos) se analizaron mediante “Western-blot” con un anticuerpo monoclonal anti-MYC (Santa Cruz, ver Materiales y Métodos). Observamos en la Figura 20E que PalA::3MYC se detecta claramente, que su movilidad electroforética está en torno a los 100 kDa (un poco por encima de su peso teórico) y que extraemos menos cantidad de esta proteína cuando se crece la cepa en medio de pH alcalino (carril 3). Por otra parte, no detectamos cambios de movilidad electroforética de la proteína en respuesta a un cambio de pH ambiental.

Hemos obtenido por consiguiente una cepa que contiene el gen *palA* etiquetado con 3 copias del epítipo MYC. Esta cepa que hemos denominado MAD1158 tiene un fenotipo silvestre, lo que indica que el triple epítipo MYC en el extremo C-terminal de la proteína no afecta a su función.

### 4.1.3.2. Construcción de una cepa que expresa PalA::3MYC y PalB::3HA.

Una vez obtenida la cepa que expresa PalA::3MYC (MAD1158), se llevó a cabo la construcción mediante cruce de una cepa que expresa PalA::3MYC y PalB::3HA. El cruce se realizó entre MAD1158 y MAD1003, una cepa obtenida en el laboratorio anteriormente que contiene *palB* etiquetado con 3 epítipos HA. Los segregantes obtenidos después del cruce fueron analizados en primer lugar mediante PCR como se indica en la Figura 21A. Para detectar la presencia del epítipo MYC, se utilizaron los oligonucleótidos OV73 y OV113, que permiten la amplificación por PCR de la región de *palA* que contiene el triple epítipo MYC. Para detectar la presencia del epítipo HA, se utilizaron los oligonucleótidos 5'palB y 3'palB, que permiten la amplificación por PCR de la región de *palB* que contiene el triple epítipo HA. Se obtiene en el caso de estar presente el epítipo MYC una banda de 0.27 Kb, mientras que si no lo está la banda es de 0.15Kb. Lo mismo sucede en el caso del epítipo HA, que produce un incremento de 0.5 Kb a 0.62 Kb como se puede observar en la Figura 21A. Se seleccionaron de esta forma 3 segregantes: el número 2 que expresa ambas proteínas etiquetadas (PalA::3MYC, PalB::3HA), el número 6 que sólo expresa la proteína PalB etiquetada (PalB::3HA) y el número 11 que sólo expresa la proteína PalA etiquetada (PalA::3MYC). El análisis fenotípico en placa (Figura 21A) muestra que las 3 cepas seleccionadas (carriles 4, 5 y 6) tienen un fenotipo silvestre, lo que demuestra que ninguno de los epítipos afecta a la función de PalA o PalB.



**Figura 21. Construcción de una cepa que expresa PalA::3MYC y PalB::3HA. A)** Análisis por PCR de 18 segregantes obtenidos y análisis fenotípico mediante crecimiento en placa de tres cepas seleccionadas (carriles “4, 5 y 6”). Los medios diagnósticos de pH 8.0, Neomicina y Molibdato se describen en la sección 3.4.2 de Materiales y Métodos. **B)** Análisis mediante “Western-blot” de PalA::3MYC, PalB::3HA y PacC con anticuerpos monoclonales contra los epítomos MYC y HA y un anticuerpo policlonal contra PacC. Las cepas utilizadas están cultivadas en un medio de pH ácido (carriles “1, 4 y 7”), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carriles “2, 5 y 8”), ó cultivadas en un medio de pH alcalino (carriles “3, 6 y 9”). Realizamos el ensayo con 50µg de extracto proteico total.

## RESULTADOS

### 4.1.3.3. Análisis de la asociación de PalA, PalB y PacC mediante coimmunoprecipitación.

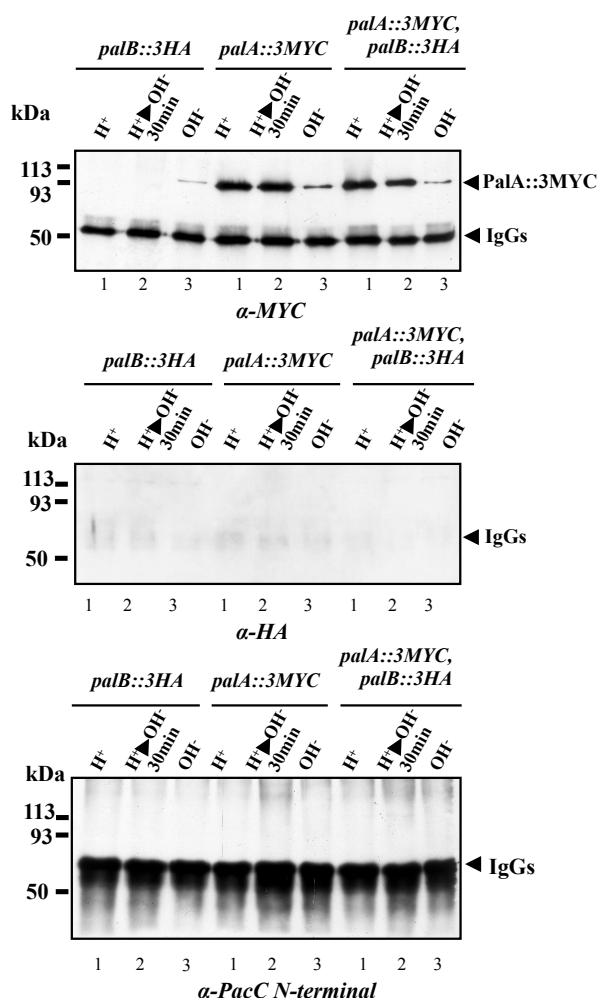
Para analizar la posible asociación de PalA, PalB y PacC *in vivo*, se utilizaron las 3 cepas seleccionadas en el apartado anterior para ensayos de coimmunoprecipitación. En la Figura 21B, se muestra el análisis mediante “Western-blot” de extractos de las 3 cepas cultivadas en un medio de pH ácido (carriles “1, 4 y 7”), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carriles “2, 5 y 8”) y cultivadas en un medio de pH alcalino (carriles “3, 6 y 9”). En el primer “Western-blot” de la Figura 21B, revelado con el anticuerpo monoclonal anti-MYC, se detecta PalA::3MYC en las cepas MAD1158 (PalA::3MYC) y MAD1160 (PalA::3MYC, PalB::3HA), mientras que en el segundo “Western-blot”, revelado con el anticuerpo monoclonal anti-HA, se detecta PalB::HA en las cepas MAD1159 (PalB::3HA) y MAD1160 (PalA::3MYC, PalB::3HA), como era de esperar. Así mismo, revelando con un anticuerpo anti-PacC (tercer “Western-blot”), vemos cómo en un medio de pH ácido no se produce procesamiento del factor de transcripción, encontrando exclusivamente la forma larga PacC<sup>72</sup>. Después de un cambio de pH ácido a pH alcalino, se observa un procesamiento parcial y se detectan las 3 formas de PacC (PacC<sup>72</sup>, PacC<sup>53</sup> y PacC<sup>27</sup>) mientras que en un medio de pH alcalino, PacC está completamente procesado, detectándose exclusivamente la forma corta PacC<sup>27</sup>.

Se puede concluir que las 3 cepas tienen un fenotipo silvestre en relación con la ruta de señalización por pH ambiental, como ya se comprobó mediante el análisis fenotípico en placa. Por otra parte PalA::3MYC y PalB::HA se detectan correctamente mediante “Western-blot”.

A continuación, se utilizaron estos mismos extractos para ensayos de coimmunoprecipitación, (ver sección 3.6.2 de Materiales y Métodos). En estos ensayos, PalA::3MYC se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-MYC y resina sefarosa acoplada a proteína A. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante “Western-blot” con un anticuerpo anti-MYC, para comprobar la correcta inmunoprecipitación de PalA::3MYC y con un anticuerpo anti-HA y anti-PacC, para detectar la posible coimmunoprecipitación de PalB::3HA y PacC con PalA::3MYC.

En el primer “Western-blot” de la Figura 22 (revelado con un anticuerpo anti-MYC) se detecta PalA, lo que significa que se ha unido a la resina correctamente, aunque observamos que la cantidad de PalA inmunoprecipitada de un extracto procedente de un cultivo en un medio de pH alcalino es menor. Sin embargo, al revelar con un anticuerpo anti-HA estos mismos inmunoprecipitados, no detectamos la proteína PalB::3HA (segundo “Western-blot”), ni tampoco la proteína PacC revelando con un anticuerpo anti-PacC (tercer “Western-blot”). Estos resultados indican que PalB y PacC no coimmunoprecipitan con PalA en estas condiciones. Este resultado podría ser debido a que la unión entre estas proteínas se produzca de forma transitoria en respuesta a la señal de pH, antes de que PacC se procese.

Nuestro siguiente objetivo por lo tanto fue intentar estabilizar el complejo que podrían formar estas proteínas y así poder detectar esta posible interacción, para lo cual utilizamos una cepa del laboratorio que contiene una mutación en el sitio de corte de PacC (*pacC209*). Esta cepa (MAD812) fue obtenida mediante mutagénesis inducida por ultravioleta en el laboratorio del profesor H. Arst y contiene una mutación que provoca la sustitución del residuo Leu498 por Ser. Esta sustitución se produce en el sitio de primer corte proteolítico de PacC, lo que provoca que PacC no pueda ser procesado<sup>28</sup>. Así, al activarse la ruta de señalización por pH ambiental, el complejo proteico se formaría para activar PacC mediante procesamiento proteolítico, pero PacC no podría ser procesado por PalB debido a esta mutación (ver esquema de la Figura 19). Por lo tanto, el complejo podría estabilizarse, permitiéndonos detectar así la asociación *in vivo* entre estas proteínas.



**Figura 22 Ensayo de coimmunoprecipitación de PalA, PalB y PacC.** Las cepas utilizadas están cultivadas en un medio de pH ácido (carriles “1”), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carriles “2”), ó cultivadas en un medio de pH alcalino (carriles “3”). Los inmunoprecipitados de extractos proteicos totales con un anticuerpo anti-MYC se analizaron mediante “Western-blot” con anticuerpos monoclonales contra los epitopos MYC y HA y un anticuerpo policlonal contra PacC. Realizamos el ensayo con 200mg de extracto proteico total inmunoprecipitado.

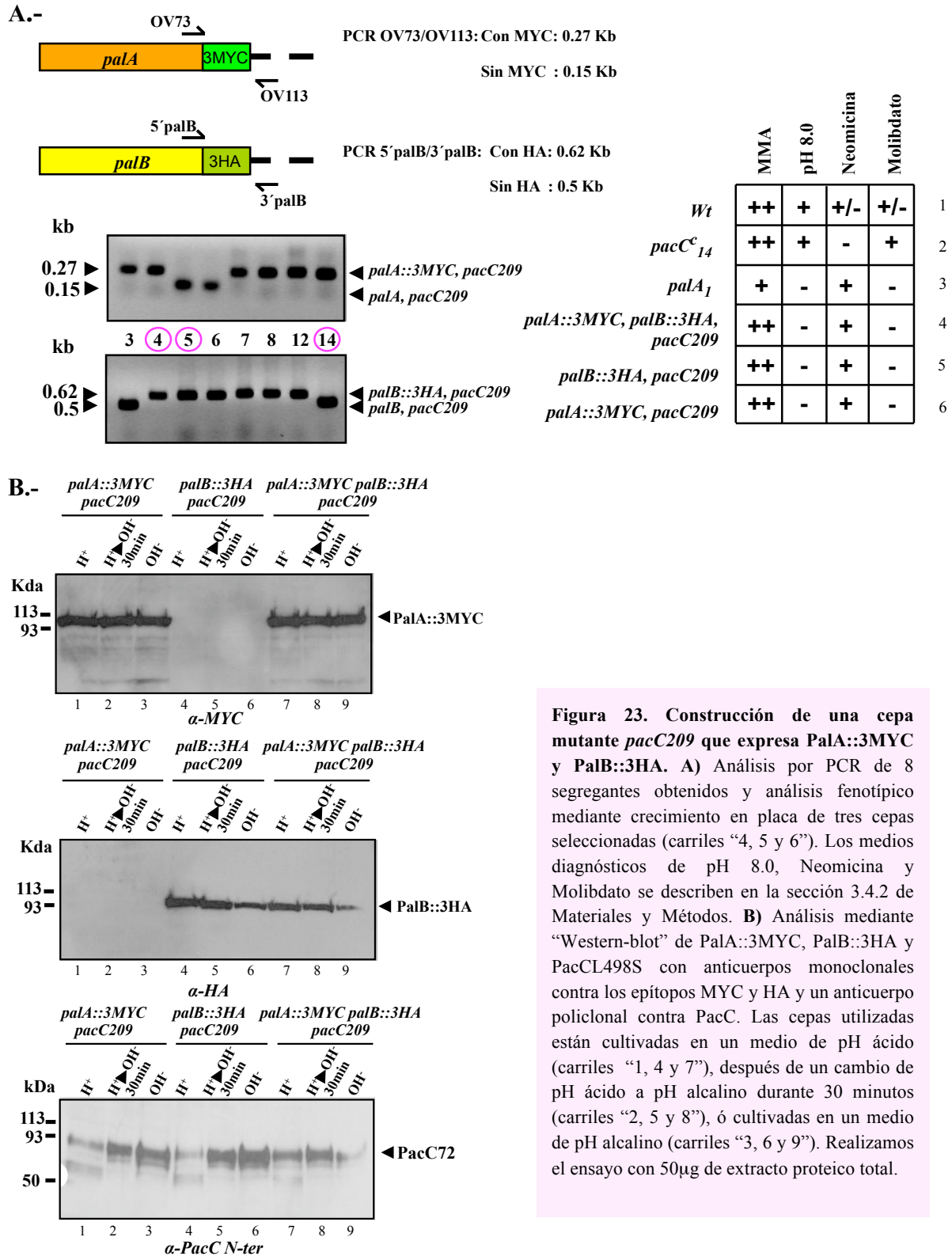
**4.1.3.4. Construcción de una cepa *pacC209 palA::3MYC palB::3HA*.**

Como ya he comentado, si es cierta nuestra hipótesis de que la interacción entre estas proteínas se produce de manera transitoria, se podría estabilizar el posible complejo formado utilizando el mutante *pacC209*. Para llevar a cabo este ensayo, cruzamos la cepa MAD1167 (*PalA::3MYC PalB::3HA*) con la cepa MAD812 (*pacC209*). Se analizó en primer lugar la sensibilidad a pH alcalino de los segregantes obtenidos del cruce, mediante análisis fenotípico en placa, ya que las cepas sensibles son las que llevan la mutación en *pacC*. Las cepas sensibles a pH alcalino preseleccionadas se analizaron por PCR como se hizo en el cruce anterior (Figura 23A). Seleccionamos de esta forma 3 segregantes, el número 4 que contiene ambas proteínas etiquetadas (*PalA::3MYC, PalB::3HA*), el número 5 que sólo contiene la proteína *PalB* etiquetada (*PalB::3HA*) y el número 14 que sólo contiene la proteína *PalA* etiquetada (*PalA::3MYC*). En la tabla de la Figura 23A podemos ver como el análisis fenotípico en placa muestra que las 3 cepas seleccionadas (carriles 4, 5 y 6) corresponden a cepas con pérdida de función en *pacC*.

**4.1.3.5. Análisis de la asociación de PalA, PalB y PacCL498S mediante coimmunoprecipitación.**

Se analizaron mediante “Western-blot” extractos de las 3 cepas cultivadas en un medio de pH ácido (carriles “1, 4 y 7”), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carriles “2, 5 y 8”) y cultivadas en un medio de pH alcalino (carriles “3, 6 y 9”).

## RESULTADOS



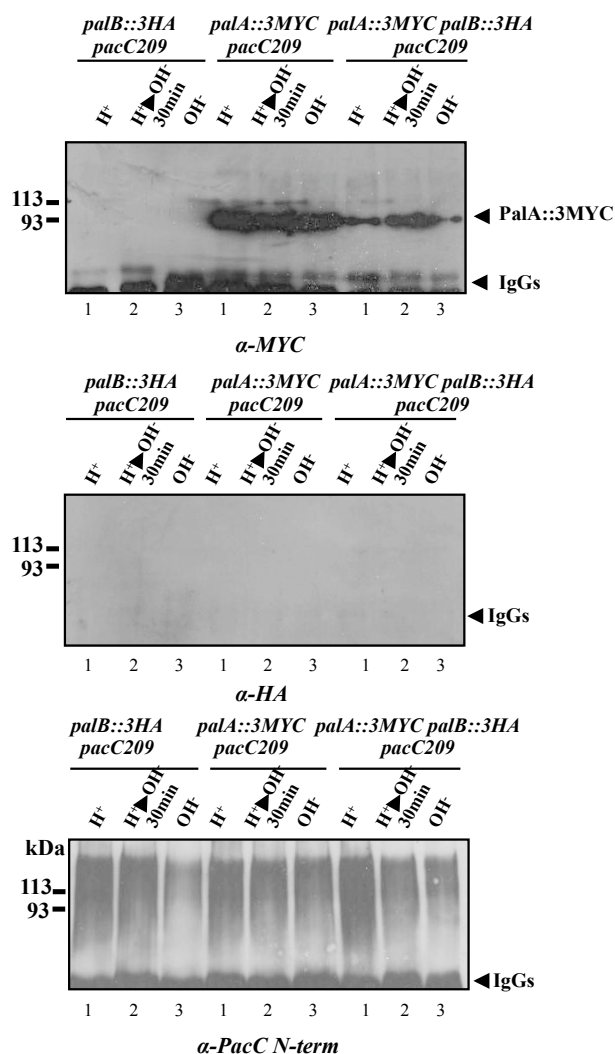
**Figura 23. Construcción de una cepa mutante *pacC209* que expresa PalA::3MYC y PalB::3HA. A) Análisis por PCR de 8 segregantes obtenidos y análisis fenotípico mediante crecimiento en placa de tres cepas seleccionadas (carriles “4, 5 y 6”). Los medios diagnósticos de pH 8.0, Neomicina y Molibdato se describen en la sección 3.4.2 de Materiales y Métodos. B) Análisis mediante “Western-blot” de PalA::3MYC, PalB::3HA y PacCL498S con anticuerpos monoclonales contra los epítomos MYC y HA y un anticuerpo policlonal contra PacC. Las cepas utilizadas están cultivadas en un medio de pH ácido (carriles “1, 4 y 7”), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carriles “2, 5 y 8”), ó cultivadas en un medio de pH alcalino (carriles “3, 6 y 9”). Realizamos el ensayo con 50µg de extracto proteico total.**

En el primer “Western-blot” de la Figura 23B, se detecta PalA::3MYC en las cepas MAD1556 (PalA::3MYC/*pacC209*) y MAD1554 (PalA::3MYC/PalB::3HA/*pacC209*) revelando con un anticuerpo anti-MYC, mientras que en el segundo “Western-blot” revelado con un anticuerpo anti-HA, se detecta PalB::3HA en las cepas MAD1555 (PalB::3HA/*pacC209*) y MAD1554 (PalA::3MYC/PalB::3HA/*pacC209*). Así mismo,

revelando con un anticuerpo anti-PacC, se observa la falta de procesamiento del factor de transcripción PacC en respuesta a un cambio de pH (sólo detectamos la forma PacC<sup>72</sup>).

Podemos concluir que las 3 cepas son mutantes *pacC209*, como ya se comprobó mediante el correspondiente análisis fenotípico.

Se procedió a realizar un ensayo de coimmunoprecipitación para comprobar si, al bloquear el procesamiento de *pacC*, seríamos capaces de detectar la unión *in vivo* de PalA con PacC y PalB. Este experimento se realizó como se describe en la sección 3.6.2 de Materiales y Métodos. En el primer “Western-blot” de la Figura 24 se puede ver cómo revelando con un anticuerpo anti-MYC detectamos PalA::3MYC unido a la resina, al igual que en el ensayo anterior, mientras que al revelar con un anticuerpo anti-HA, no se detectó la proteína PalB::3HA (segundo “Western-blot”). Tampoco se detectó la proteína PacC revelando con un anticuerpo anti-PacC (tercer “Western-blot”). En resumen, no detectamos la asociación de PalA con PalB y PacC mediante coimmunoprecipitación de extractos celulares, aunque sabemos que PalA y PacC interactúan *in vitro* o en el sistema de doble-híbrido .



**Figura 24. Ensayos de coimmunoprecipitación con una cepa mutante *pacC209* que expresa PalA::3MYC y PalB::3HA.** Las cepas utilizadas están cultivadas en un medio de pH ácido (carriles “1”), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carriles “2”), ó cultivadas en un medio de pH alcalino (carriles “3”). Los inmunoprecipitados de extractos proteicos totales con un anticuerpo anti-MYC se analizaron mediante “Western-blot” con anticuerpos monoclonales contra los epítomos MYC y HA y un anticuerpo policlonal contra PacC. Realizamos el ensayo con 200mg de extracto proteico total inmunoprecipitado.

### 4.2. PalF: UNA PROTEÍNA RELACIONADA CON LAS ARRESTINAS DE MAMÍFEROS.

Las arrestinas son proteínas cuya función principal es bloquear la señal de receptores con 7 hélices membrana a través de su interacción con dominios citoplásmicos de estos receptores<sup>173</sup>. Además de mediar la inactivación del receptor mediante su reclutamiento hacia la vía endocítica, las arrestinas actúan como adaptadores para otras moléculas y es así como activan otras rutas de señalización<sup>121,174</sup> (ver introducción).

En el hongo *Aspergillus nidulans*, la transducción de la señal de pH alcalino se produce a través de los genes *pal*, dando lugar al procesamiento del factor de transcripción PacC. PalH y PalI son proteínas con 7 y 3 hélices transmembrana respectivamente, probablemente localizadas en la membrana plasmática, siendo, por lo tanto, los posibles sensores de la señal de pH ambiental.

Aunque análisis previos de la secuencia aminoacídica de miembros de la familia de PalF no revelaron similitudes significativas con proteínas de función conocida, el análisis de la secuencia de PalF con la base de datos PFAM junto con la de sus homólogos en otros hongos (*S.cerevisiae*, *C. albicans* y *Y. lipolitica*) permitió la detección de dominios conservados presentes en las proteínas de la familia de las arrestinas (Figura 25). Estas regiones conservadas corresponden a los dominios N-terminal y C-terminal de las arrestinas (en la Figura 25A, en azul y en verde, respectivamente). Cada dominio está compuesto por 7 láminas beta. En color naranja se indica la posición de las láminas beta en la estructura de la arrestina visual bovina y en color rosa se indica la posición de las laminas-beta predichas para PalF. Estas láminas beta están unidas entre sí por lazos que corresponden a secuencias no conservadas. En la Figura 25B podemos ver la estructura terciaria de la beta-arrestina y los dos dominios que la componen.

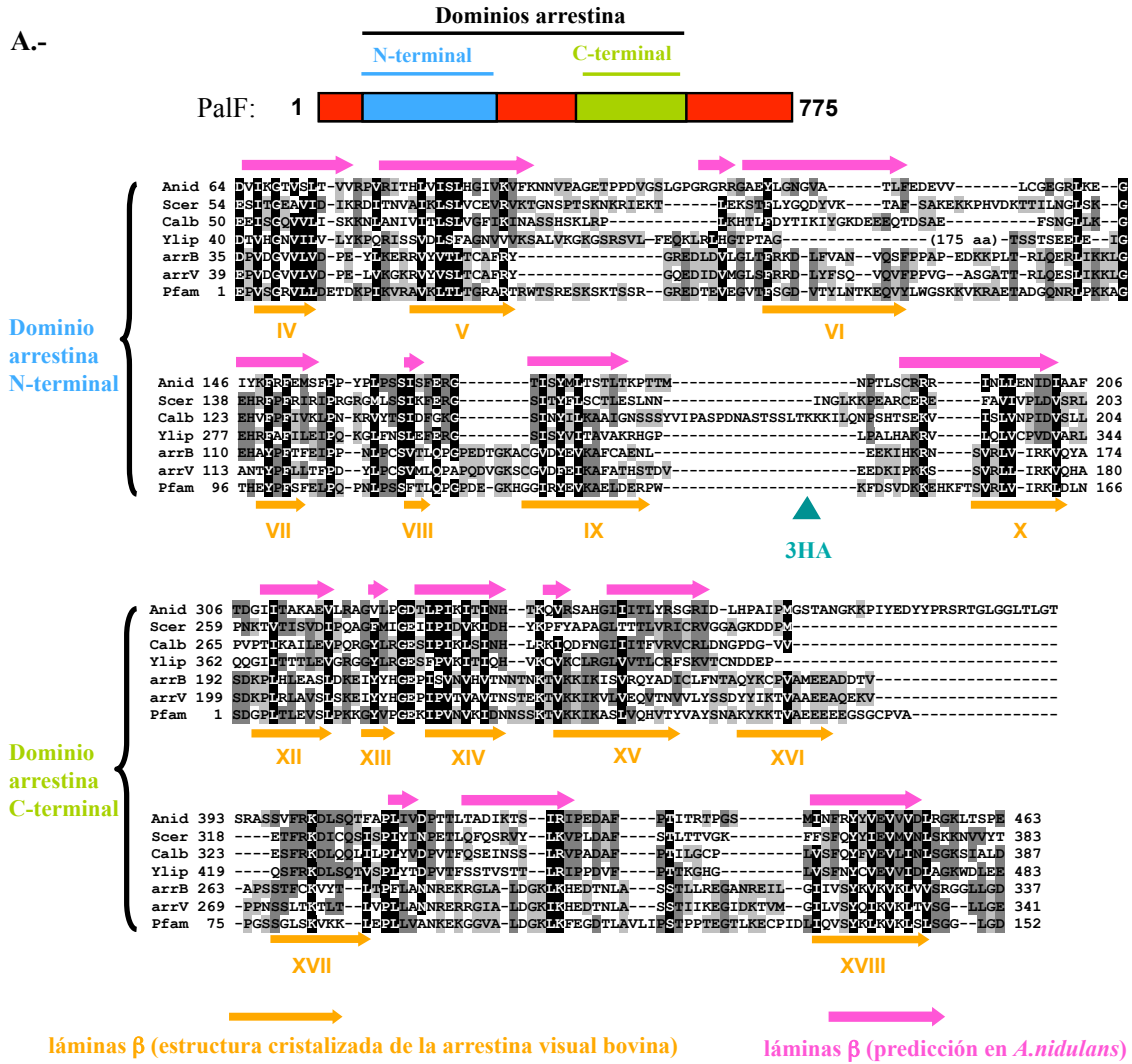
Estudios previos del laboratorio demostraron, mediante ensayos de doble-híbrido, que PalH interacciona con PalF. Así mismo, mediante ensayos de unión *in vitro*, se determinó que esta unión es directa y que la proteína PalF interacciona, a través de su dominio arrestina N-terminal, con dos regiones localizadas en cada extremo de la cola citoplásmica C-terminal de PalH.

Estos resultados, junto con la homología de secuencia entre palF y las arrestinas de mamíferos, indican que PalF es una proteína relacionada con las arrestinas. La función de las arrestinas en tráfico intracelular está regulada mediante fosforilación y ubiquitinación. Dada la aparente conexión entre la ruta de transducción de la señal de pH en hongos y la vía endocítica (ver introducción), decidimos investigar los posibles mecanismos de regulación de la proteína PalF mediante el análisis de sus modificaciones postraduccionales.

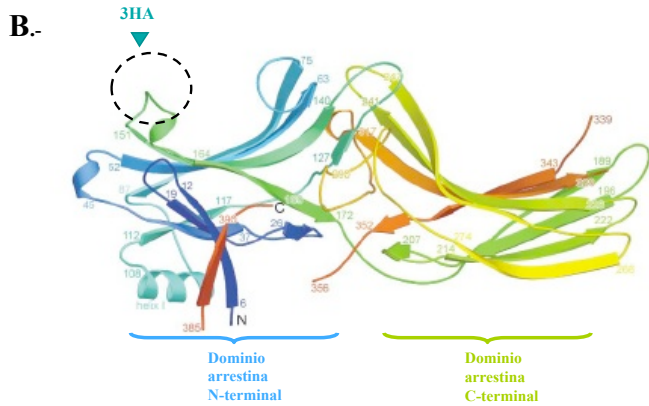
#### 4.2.1. Construcción de una cepa que expresa PalF::3HA mediante reemplazamiento génico.

El alineamiento de la secuencia aminoacídica de PalF con la de sus homólogos en otros hongos indica que las regiones menos conservadas en los dominios arrestina son las que corresponden a los lazos que unen las láminas beta entre sí. Por lo tanto, estas regiones son buenas candidatas para la introducción de epítomos que no comprometan la estructura y la función de la proteína. Para etiquetar PalF, decidimos introducir 3 copias del epítomo HA en una región de la proteína correspondiente al lazo que se encuentra entre las láminas beta IX y X del dominio arrestina N-terminal (como se describe en la sección 3.3.1 de Materiales y Métodos). En el alineamiento múltiple de la Figura 25A, podemos ver que el epítomo introducido se localiza en uno de los lazos no conservados (después del residuo 185 en PalF) entre láminas beta. En la Figura 25B, podemos observar la localización del lazo correspondiente en la estructura terciaria de la  $\beta$ -arrestina.





**Figura 25. Alineamiento de la secuencia de PalF con la de sus distintos homólogos en otros organismos y estructura 3D de la beta-arrestina.** A) Conservación de los dominios arrestina N-terminal (en azul) y C-terminal (en verde) en PalF (Anid, *Aspergillus nidulans*), Rim8 (Scer, *Saccharomyces cerevisiae*; Calb, *Candida albicans*; Ylip, *Yarrowia lipolytica*), beta-arrestina 1 humana (arrB), arrestina visual bovina (arrV) y los dominios PFAM consenso para ambos dominios de las arrestinas. Se muestra la localización de las regiones conservadas mediante flechas, en naranja las láminas beta de la estructura cristalizada de la beta-arrestina y en rosa la predicción en hongos de las láminas beta. Se indica la localización del epítipo (3HA) introducido. En negro se muestran los residuos totalmente conservados, en gris oscuro los residuos con grado de conservación elevado y en gris claro los que tienen un grado de conservación medio. Los números indican la posición de los aminoácidos. B) Estructura terciaria de la beta-arrestina indicando la localización correspondiente del epítipo introducido (3HA) en PalF.



## RESULTADOS

Una vez obtenido el plásmido con *palF::3HA*, éste se utilizó para llevar a cabo el reemplazamiento génico del alelo de pérdida de función *palF<sub>15</sub>* en la cepa MAD900 (ver 3.4.4.2. en Materiales y Métodos). El gen *palF* de esta cepa contiene un codon de parada después del residuo Leu188, con lo que al liberar el transgen como un fragmento *EcoRI/ClaI*, se produce la reparación del gen mediante doble cruzamiento (ver Figura 26A). La probabilidad de que se produzcan ambos sucesos (reparación del gen e integración del epítipo) es muy alta debido la cercanía del epítipo y la mutación (residuos 185 y 188 respectivamente). Se seleccionaron los transformantes creciéndolos en un medio selectivo a pH 8.5 y se confirmó, en primer lugar, la presencia del epítipo 3HA mediante PCR y por lo tanto el evento de recombinación homóloga. La reacción de PCR se realizó con los oligonucleótidos OV40 y OV41. El cebador OV41 hibrida inmediatamente antes del epítipo, mientras que OV40 lo hace en la secuencia del epítipo (Fig 27B). La integración del gen etiquetado da lugar a una banda de 0.27 kB (clones 1, 3, 4, 6 y 10), mientras que en el caso de no integración no se detecta esta banda (WT, y clones 2 y 5). Mediante análisis de crecimiento en placa se comprobó que las 5 cepas preseleccionadas por PCR tenían un fenotipo idéntico al de una cepa silvestre (WT en la tabla de la Figura 26B).

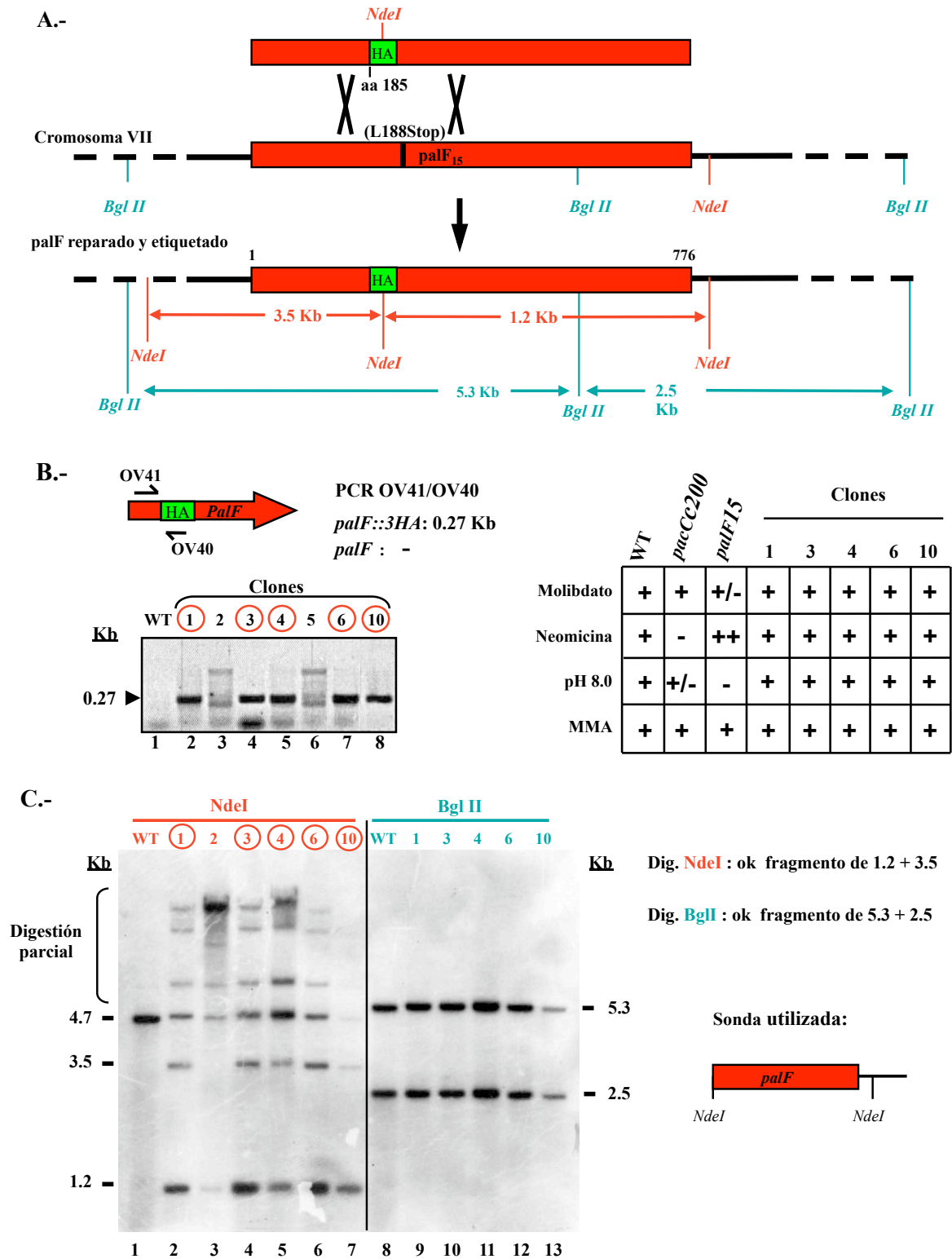
Las cepas preseleccionadas (clones 1, 3, 4, 6 y 10), se analizaron también mediante “Southern-blot” para comprobar la presencia de una única copia del gen etiquetado integrado en su locus (Figura 26C). El ADN total de cada cepa se digirió con la enzima de restricción *NdeI* y se utilizó como sonda un fragmento del gen *palF* digerido con *NdeI* de 1.2 kb (Figura 26C). La integración correcta de *palF::HA* da lugar a dos bandas de 3.5 kb y 1.2 kb, mientras que en aquellos clones que no han integrado *palF::HA*, se observa una sola banda de 4.7 kb.

Las bandas que se detectan por encima de 4.7 kb son el resultado de la digestión parcial del ADN con *NdeI*. Se llevó a cabo otro ensayo de “Southern-blot” en el que se digirió el ADN total con la enzima *BglII*. En este caso se obtienen 2 bandas, de 5.3 kb y 2.5 kb en el caso de una cepa silvestre así como en el caso de un transformante con una integración correcta. Se pretendía de esta forma confirmar la integración de una única copia de *palF*. La cepa seleccionada (clon 1) denominada MAD1152 es la que se ha utilizado en todos los estudios de PalF.

### 4.2.2. Detección de PalF::3HA mediante ensayos de “Western-blot”.

#### 4.2.2.1. Optimización de las condiciones de extracción de PalF.

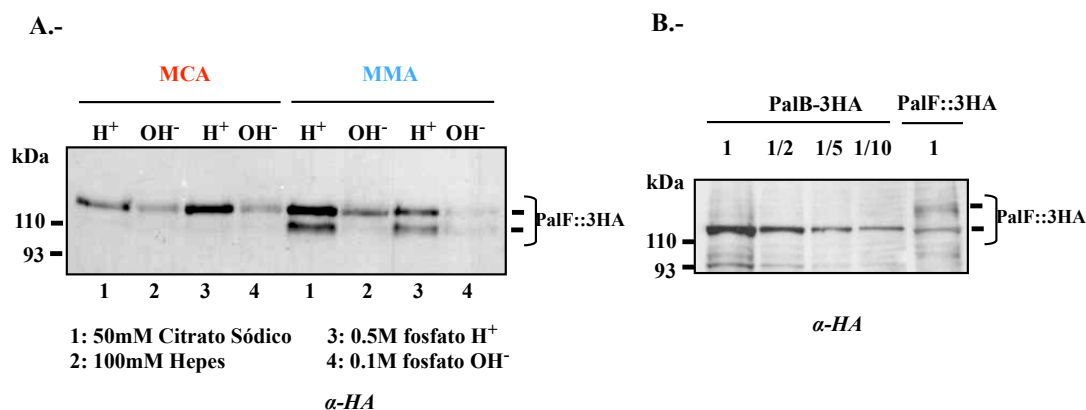
Una vez construida la cepa que expresa PalF::3HA, comprobamos su correcta detección en un ensayo de “Western-blot”. Para optimizar la extracción y detección de esta proteína, se realizaron ensayos variando las condiciones de cultivo y extrayendo la proteína con distintos tampones. En la Figura 27A, se comparan los resultados obtenidos con extractos de una cepa cultivada en Medio Completo (MCA, en rojo) ó en Medio Mínimo (MMA, en azul) de pH ácido, ajustado con 50 mM Citrato Sódico (carriles “1”) ó con 0.5 M fosfato ácido (carriles “3”) y de pH alcalino, ajustado con 100 mM Hepes (carriles “2”) ó con 0.1 M fosfato alcalino (carriles “4”). En ensayos de “Western-blot”, se detectan 2 bandas cuando el micelio procede de un cultivo en medio mínimo ácido, mientras que solo se detecta la banda de menor movilidad cuando el micelio procede de un cultivo en medio completo. Las bandas detectadas corresponden a un peso molecular ligeramente superior a 110 kDa, es decir por encima del peso teórico de PalF::3HA, en torno a los 90 kDa. No se observó una mejora significativa en la extracción de PalF::3HA al incrementar la concentración de detergente (triton) en el tampón de extracción (tampón IP, ver Materiales y Métodos).



**Figura 26. Construcción de una cepa que expresa PalF::3HA.** A) Esquema del reemplazamiento génico del alelo *palF*<sub>15</sub> por la construcción *palF::3HA*. *palF* se muestra en rojo, la mutación en *palF* en negro y el epítipo 3HA en verde. B) Análisis por PCR de los transformantes obtenidos (los clones que contienen el epítipo 3HA están rodeados por un círculo rojo) y análisis fenotípico en placa de los clones preseleccionados. C) Ensayo de “Southern-blot” de los clones preseleccionados junto a una cepa silvestre (WT). Se muestra el resultado de la hibridación, con una sonda radiactiva formada por un fragmento de 1.2 kb del gen *palF* digerido con *NdeI*. Los clones en los cuales se ha realizado el reemplazamiento génico de forma correcta se muestran con un círculo rojo alrededor. Los tamaños de las bandas se indican en kb.

## RESULTADOS

Para descartar la posibilidad de que la banda de mayor movilidad estuviera producida por la existencia de un sitio alternativo de inicio de la traducción de la proteína, se inspeccionó el inicio de la secuencia codificante de *palF*. Se comprobó que no existe un segundo sitio de inicio de la traducción de la proteína que pudiera dar lugar a esta segunda banda, lo que sugiere que la banda de mayor movilidad se debe a la degradación de la proteína.



**Figura 27. Análisis y detección de la proteína PalF::3HA mediante ensayos de “Western-blot”.** A) Análisis mediante “Western-blot” con un anticuerpo anti-HA de 50µg de extracto proteico total para comparar la extracción de PalF::3HA de micelio cultivado en medio MCA (rojo) ó MMA (azul) y a distintos pHs (pH ácido: 50 mM Citrato Sódico (carriles “1”) ó 0.5 M fosfato ácido (carriles “3”) y pH alcalino: 100 mM Hepes (carriles “2”) ó 0.1 M fosfato alcalino (carriles “4”). B) Análisis mediante “Western-blot” con un anticuerpo anti-HA de extractos proteicos totales de protoplastos procedentes de cepas que expresan PalB::3HA (concentraciones decrecientes) y PalF::3HA.

### 4.2.2.2. Análisis de los niveles de expresión de PalF.

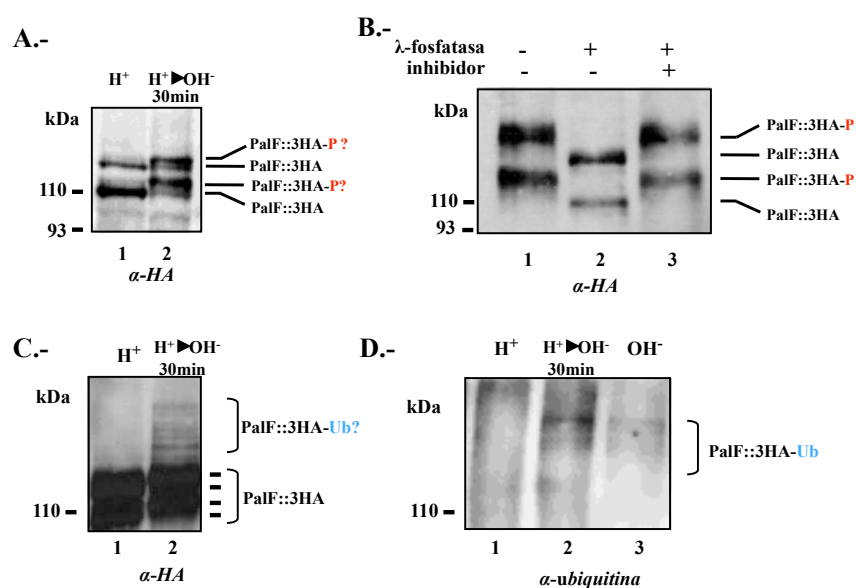
Para realizar este ensayo, se preparo un extracto proteico total mediante un procedimiento suave (protoplastos) ya que los primeros resultados obtenidos sugerían que esta proteína podría degradarse con otros métodos de extracción (ver Resultados 4.2.2.1.). Como control positivo del ensayo de “Western-blot”, se utilizaron extractos de protoplastos procedentes de la cepa MAD1003, que expresa PalB::3HA, cuya detección ya fue comprobada con anterioridad en el laboratorio. Para poder comparar las cantidades de PalF::3HA y PalB::3HA, se prepararon distintas diluciones del extracto con PalB::3HA. Podemos ver en el “Western-blot” de la Figura 27B que los niveles de expresión de PalF::3HA son más bajos que los de PalB::3HA (más ó menos 10 veces). Es destacable que se detecta una sola banda con micelio procedente de cultivo en medio mínimo ácido cuando el método de extracción de proteínas es más suave (preparación de protoplastos), lo que sugiere que la banda de mayor movilidad detectada anteriormente se debe a la degradación de una fracción de la proteína durante la preparación de los extractos. Por otra parte, se observa una banda más difusa, de menor movilidad, que podría ser el resultado de la modificación postraduccional de una fracción de la proteína.

### 4.2.2.3. Efectos del pH ambiental sobre la movilidad electroforética de PalF.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de cultivo para la extracción de PalF::3HA, nos centramos en el análisis de su movilidad electroforética. Con el objetivo de incrementar la cantidad y pureza de PalF::3HA extraída, se prepararon inmunoprecipitados de extractos procedentes de un cultivo en medio mínimo ácido, utilizando una resina que lleva el anticuerpo anti-HA acoplado covalentemente (ver sección 3.6.1 de Materiales y Métodos).

De acuerdo con los resultados anteriores, el análisis mediante “Western-blot” de los inmunoprecipitados permite la detección de 2 bandas correspondiente a un peso molecular superior a 110 kDa, siendo la de mayor movilidad el resultado probable de la degradación de una fracción de la proteína durante la preparación de los extractos (Figura 28A, carril 1). Sin embargo, cuando se cultiva la cepa en un medio de pH ácido y se hace un cambio a pH alcalino durante 30 minutos, estas dos bandas se desdoblán, convirtiéndose en dos dobletes ó 4 bandas (carril 2 de la Figura 28A). El desdoblamiento de las 2 bandas se detecta cuando la ruta de señalización por pH ambiental está activada, por lo que pensamos que pudiera ser debido a una modificación postraduccional de la PalF::3HA en respuesta a la señal de pH.

Las arrestinas de mamífero están reguladas mediante fosforilación y ubiquitinación de manera dependiente de la señal, lo que nos llevó a investigar en primer lugar qué tipo de modificaciones postraduccionales sufre PalF::3HA.



**Figura 28.** A) “Western-blot” en el que se muestra el cambio de movilidad electroforética de PalF::3HA al realizar un cambio de medio de pH ácido a pH alcalino. Los inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA de extractos proteicos totales provienen de micelio cultivado en medio mínimo (MMA) de pH ácido (50 mM Citrato Sódico), antes (carril 1) y después (carril 2) de un cambio a pH alcalino (100 mM Hepes) durante 30 minutos. **B)** Tratamiento con lambda-fosfatasa del inmunoprecipitado preparado después de un cambio de pH ácido a pH alcalino: control sin enzima (carril 1), muestra con fosfatasa (carril 2), muestra con fosfatasa y 10 mM del inhibidor Vanadato sódico (carril 3). **C)** Película sobreexpuesta del “Western-blot” de la Figura A) en el que se revelan varias bandas por encima del doblete principal. **D)** “Western-blot” revelado con un anticuerpo anti-ubiquitina del inmunoprecipitado (anti-HA) correspondiente a un cultivo en medio de pH ácido (carril 1), después de un cambio de pH ácido a pH alcalino durante 30 minutos (carril 2), y de un cultivo en medio alcalino (carril 3).

#### 4.2.2.4. Fosforilación y ubiquitinación de PalF en respuesta a un incremento del pH ambiental.

Estudiamos la posible fosforilación de PalF::3HA mediante un ensayo de defosforilación *in vitro*. Se cultivó el micelio durante 24h en un medio de pH ácido y luego se transfirió a un medio de pH alcalino durante 30 minutos. Se inmunoprecipitó la proteína PalF::3HA como se ha descrito anteriormente (ver Materiales y Métodos) para posteriormente tratar este extracto con proteína  $\lambda$ -fosfatasa (durante 20 minutos a una temperatura de 30°C). En la Figura 28B, se observa un aumento de la movilidad del doblete cuando ha sido tratado con la

## RESULTADOS

proteína  $\lambda$ -fosfatasa (carril 2), mientras que cuando tratamos el extracto con la proteína  $\lambda$ -fosfatasa y con un inhibidor de la enzima (Vanadato sódico), no se produce este cambio de movilidad (carril 3). La movilidad electroforética observada en el carril 2 coincide con la que se obtiene con extractos procedentes de un cultivo en un medio de pH ácido. Este cambio de movilidad indica, por lo tanto, que PalF se fosforila al cambiar el pH del cultivo de ácido a alcalino.

La sobre-exposición de la película en el ensayo de “Western-blot” permite la detección de varias bandas de menor movilidad en el carril que contiene los extractos correspondientes al micelio transferido a un medio de pH alcalino (Figura 28C, carril 2). En contraste, estas bandas no se detectan con extractos procedentes de un cultivo a pH ácido (Figura 28C, carril 1).

La escalera formada por estas bandas de menor movilidad recuerda el patrón de migración correspondiente a la ubiquitinación de proteínas. Sabemos que las  $\beta$ -arrestinas pueden ser ubiquitinadas y por lo tanto estudiamos la posible ubiquitinación de PalF::3HA. La detección de la ubiquitina se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-ubiquitina. El análisis mediante “Western-blot” con un anticuerpo anti-ubiquitina de inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA permite la detección de la escalera de bandas visualizadas previamente, lo que demuestra que estas bandas corresponden efectivamente a la ubiquitinación de la proteína. PalF esta ubiquitinada en extractos de cultivos crecidos en un medio de pH ácido y transferidos a un medio de pH alcalino, así como en extractos de cultivos crecidos en un medio de pH alcalino (Figura 28D, carriles 2 y 3, respectivamente). Por el contrario, estas bandas no se detectan en extractos de cultivos crecidos en un medio de pH ácido en el que la ruta no está activa (Figura 28D, carril 1). Estas bandas se corresponden, por su peso molecular, con las detectadas con el anticuerpo anti-HA en la Figura anterior. Teniendo en cuenta que PalF forma dos dobletes resultados de la degradación y de la fosforilación de la proteína, el patrón de ubiquitinación observado en la Figura 28C sería consistente con la adición de 2 moléculas de ubiquitina por molécula de PalF.

Como conclusión, podemos decir que todos estos resultados confirman la relación entre PalF y las arrestinas de mamíferos ya que estas proteínas están sujetas a las mismas modificaciones postraduccionales en respuesta a la señal (fosforilación y ubiquitinación). PalF es, por lo tanto, la primera proteína relacionada con las arrestinas descrita fuera de metazoos.

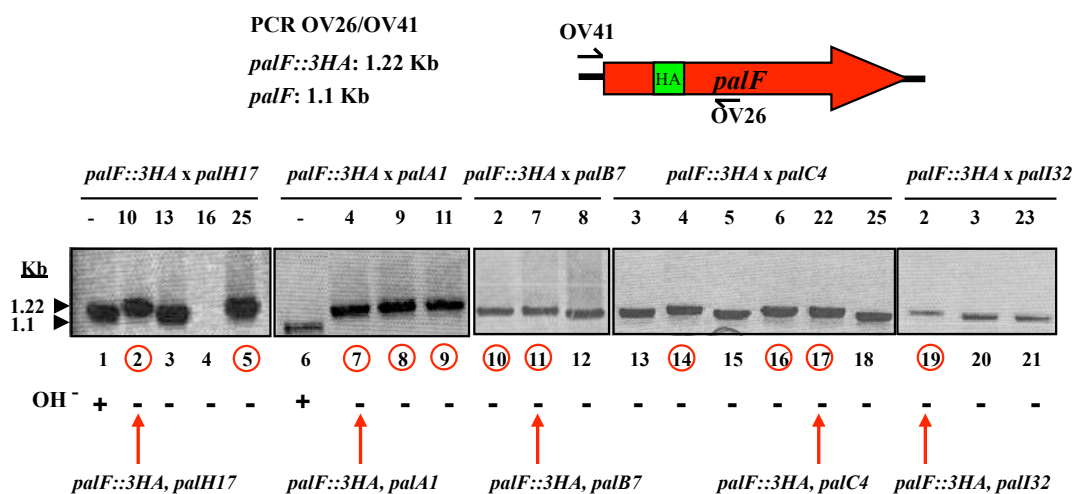
### 4.2.3. Fosforilación y ubiquitinación de PalF en los mutantes *pal*.

Una vez analizada la regulación de PalF::3HA mediante modificaciones postraduccionales en respuesta a un cambio de pH, quisimos comprobar como ésta puede verse modificada ó afectada en los distintos fondos mutantes de la ruta a la que pertenece. De esta manera, podríamos determinar también el orden de actuación de los distintos componentes de esta ruta, corriente arriba y abajo de PalF. Para ello se construyeron, mediante cruce, cepas mutantes (*palH17*, *palA1*, *palB7*, *palC4* y *palI32*) que expresen PalF::3HA.

#### 4.2.3.1. Construcción de cepas mutantes *pal* que expresan PalF::3HA

Se construyeron estas cepas cruzando la cepa etiquetada en PalF (MAD1152) con las cepas mutantes *palH17* (MAD982), *palA1* (MAD341), *palB7* (MAD855), *palC4* (MAD190) y *palI32* (MAD976), descritas en Materiales y Métodos. Se seleccionaron en primer lugar los segregantes portadores de la mutación PantoB<sub>100</sub>, ya que el locus correspondiente está ligado a *palF::3HA*, además de los segregantes sensibles a pH alcalino (OH<sup>-</sup>) ya que los mutantes *pal* no pueden crecer en un medio de pH alcalino.

De esta primera selección, se identificaron mediante PCR los que contienen *palF::3HA* utilizando los oligonucleótidos OV41 y OV26. Estos oligonucleótidos amplifican una región de 1220 pb en el caso de contener el epítipo y de 1100 pb en el caso de no tenerlo, ya que ambos hibridan en 5' y 3' del epítipo como se observa en el esquema de la Figura 29. En esta misma figura, podemos ver cómo la mayoría de las cepas preseleccionadas mediante el análisis fenotípico llevan PalF etiquetado. Seleccionamos así un segregante de cada cruce, que contiene *palF::3HA* y uno de los genes de la ruta *pal* mutado, para posteriores estudios. Se utilizó la nomenclatura del laboratorio para nombrar a las cepas construidas: MAD1395 (*palA1*, *palF::3HA*), MAD1396 (*palC4*, *palF::3HA*), MAD1397 (*palI32*, *palF::3HA*), MAD1398 (*palB7*, *palF::3HA*) y MAD1552 (*palH17*, *palF::3HA*).



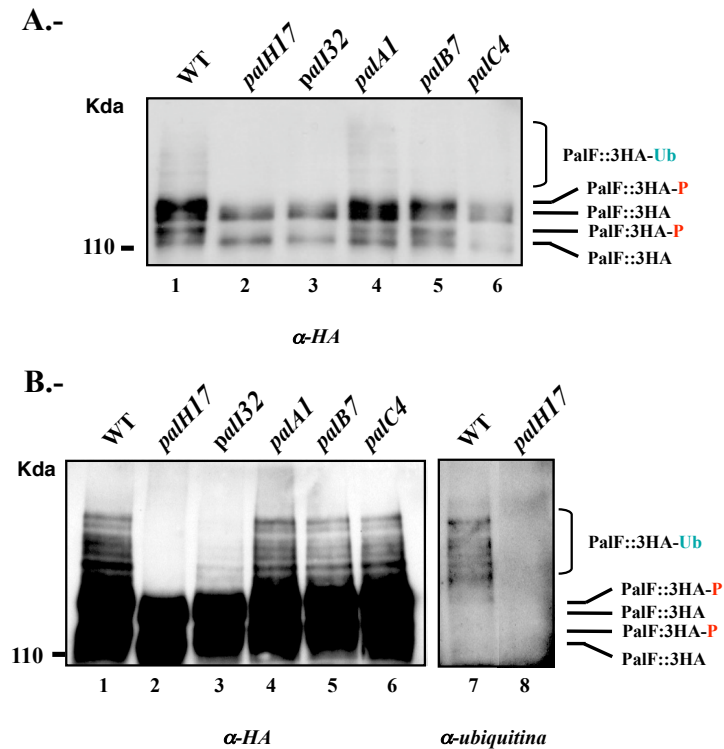
**Figura 29. Obtención de mutantes *pal* que expresan PalF::3HA mediante cruce.** A) Análisis de los segregantes de los distintos cruces (mutantes *pal* x *palF::3HA*) por PCR utilizando los oligonucleótidos OV26 y OV41. La presencia del epítipo 3HA en *palF* da lugar a un producto de PCR de 1220 pb en vez de 1100 pb; los círculos rojas indican las cepas que contienen *palF::3HA*, todas son mutantes *pal* ya que han sido preseleccionadas por su falta de crecimiento a pH alcalino, excepto los controles (carriles 1 y 6). Las flechas rojas indican la cepa seleccionada de cada cruce.

#### 4.2.3.2. Modificaciones postraduccionales de PalF en los mutantes *pal*.

Las cepas obtenidas se cultivaron en MMA a pH ácido y se pasaron a un medio MMA de pH alcalino durante 30 minutos. Se inmunoprecipitaron extractos proteicos de cada cepa con resina acoplada a anti-HA (ver Materiales y Métodos 3.6.1.) y los inmunoprecipitados se analizaron mediante "Western blot". En el carril 1 de la Figura 30A se detecta PalF::3HA en una cepa silvestre (WT), confirmando la presencia de los 2 dobletes que son el resultado de la degradación de la proteína por una parte, y de su fosforilación por otra parte. Lo mismo se observa con los mutantes de la ruta *palA1*, *palB7* y en menor medida *palC4* (carriles 4, 5 y 6). Sin embargo, el desdoblamiento de cada una de las 2 bandas no se observa, ó esta muy reducido, con los mutantes *palH17* y *palI32* (carriles 2 y 3, respectivamente), lo que indica que la fosforilación de PalF::3HA está bloqueada en estos mutantes. Este resultado coloca a ambas proteínas corriente arriba de PalF en la ruta de señalización por pH ambiental y a PalA, PalB y PalC corriente abajo.



## RESULTADOS



**Figura 30. Análisis mediante “Western-blot” de PalF::3HA en mutantes *pal*.** A) “Western-blot” en el que se muestra el cambio de movilidad de PalF::3HA al realizar un cambio de pH en las distintas cepas mutantes y en la cepa silvestre. Los inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA de extractos proteicos totales provienen de micelio cultivado en medio mínimo (MMA) de pH ácido (50 mM Citrato Sódico) después de un cambio a pH alcalino (100 mM Hepes) durante 30 minutos. B) Película sobreexpuesta del “Western-blot” de la Figura A) en el que se revela una escalera de bandas de menor movilidad que el doblete principal. Los “Western-blot” han sido revelados con un anticuerpo monoclonal anti-HA ó con un anticuerpo anti-ubiquitina (anti-Ub)

En la Figura 30B se muestra una película sobreexpuesta, que corresponde al mismo gel que el de la Figura 30A. De esta manera, es posible detectar las bandas que corresponden a la ubiquitinación de PalF descritas anteriormente para la cepa silvestre (carril 1). Así mismo, la ubiquitinación de PalF::3HA se detecta en los mutantes de la ruta *palA1*, *palB7* y *palC4* (carriles 4, 5 y 6). Sin embargo, los resultados obtenidos en los carriles 2 y 3, indican que la ubiquitinación de PalF::3HA está bloqueada totalmente en el mutante *palHI7* y parcialmente en el mutante *palI32*.

Confirmamos esta deficiencia en ubiquitinación de PalF del mutante de la ruta, *palHI7*, en un “Western-blot” revelado con el anticuerpo anti-ubiquitina. En la Figura 30B podemos ver claramente que en el carril 7 (cepa silvestre), se observa un patrón de bandas correspondiente a la ubiquitinación de PalF::3HA, mientras que en el carril 8, correspondiente al mutante *palHI7*, no se detecta ninguna banda.

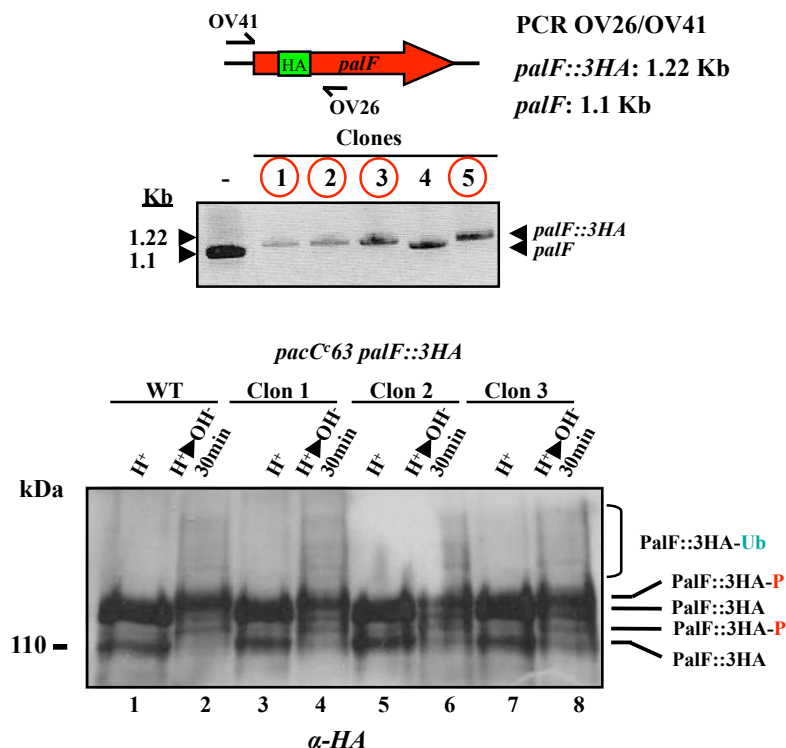
Todos estos datos indican que ambas proteínas, PalH y PalI, actúan corriente arriba de PalF en la ruta de transducción de la señal de pH, mientras que el resto de las proteínas de la ruta actuarían corriente abajo, ya que las mutaciones correspondientes no afectan a las modificaciones postraduccionales de PalF. También podemos concluir que para que se produzca la modificación de PalF son necesarias ambas proteínas, PalH y PalI, aunque esta última no es imprescindible ya que la ruta solo está bloqueada parcialmente en el mutante *palI32*.

### 4.2.3.3. Efecto de la mutación *pacC*<sup>63</sup> sobre PalF.

Estudios del grupo de A.P. Mitchell, sugieren que existe una regulación de la expresión de Rim8 (homólogo de PalF en *S.cerevisiae*) por el factor de transcripción, Rim101 (PacC en la ruta *pal* de *A. nidulans*). Esta regulación podría ser debida a la presencia de sitios de unión de Rim101 en el promotor de *RIM8*, actuando éste como represor<sup>50</sup>.



Quisimos saber si la expresión de una forma mutante de PacC activa de forma constitutiva (*pacC*<sup>63</sup>) afecta la regulación de la expresión y/o modificaciones postraduccionales de PalF. Mediante un cruce realizado por el profesor H.N. Arst en Londres, se obtuvieron segregantes que contienen *palF::3HA* y *pacC*<sup>63</sup>. Los segregantes con *pacC*<sup>63</sup> se seleccionaron mediante análisis fenotípico (activación constitutiva de la ruta de señalización por pH ambiental). Por otra parte, se analizó por PCR (con los oligonucleótidos OV41 y OV26) la presencia del gen que expresa PalF etiquetado con 3HA en estos segregantes. En la Figura 31, podemos ver que todos los segregantes contienen *palF::3HA*, excepto el número 4. Por lo tanto, seleccionamos las cepas 1, 2 y 3 para realizar el experimento.



**Figura 31. Análisis mediante “Western-blot” de PalF::3HA en un mutante *pacC*<sup>63</sup>.** Identificación por PCR de los segregantes que expresan PalF::3HA. Los clones positivos han sido enmarcados con un círculo rojo. “Western-blot” con los extractos proteicos de la cepa silvestre (WT) (carril 1 y 2) y de los mutantes *pacC*<sup>63</sup> seleccionados (números 1, 2 y 3). Los extractos proteicos totales provienen de micelio cultivado en medio mínimo (MMA) de pH ácido (50 mM Citrato Sódico), antes y después de un cambio a pH alcalino (100 mM Hepes) durante 30 minutos. Realizamos el ensayo con un anticuerpo anti-HA y con 50 $\mu$ g de extracto proteico total.

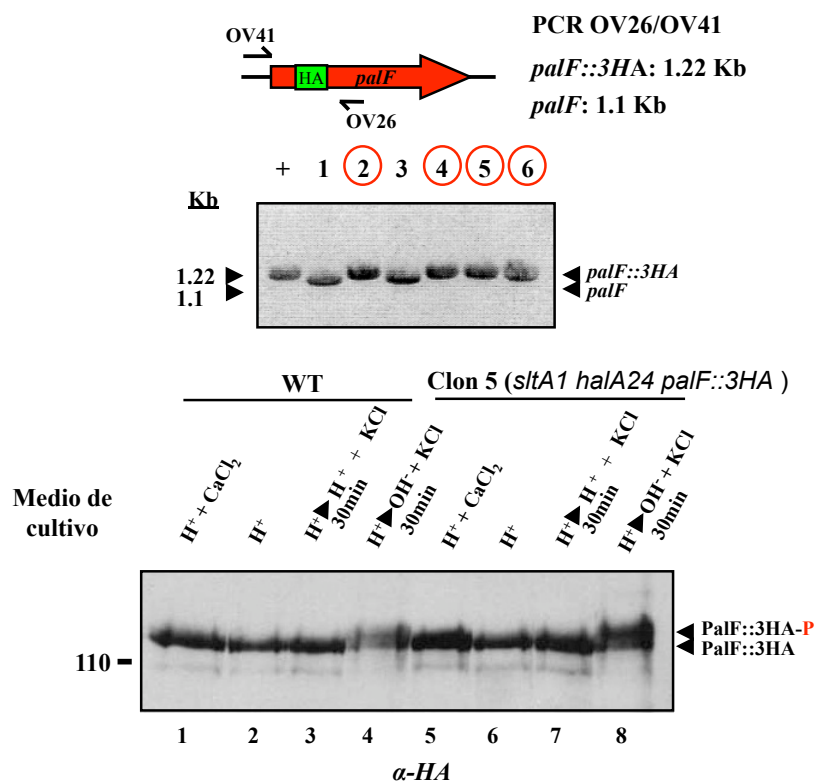
Estas cepas se cultivaron junto con la cepa MAD1153 (WT), en medio mínimo ácido y se realizó un cambio a pH alcalino durante 30 minutos. En el “Western-blot” que se muestra en la Figura 31, podemos observar que tanto la expresión de PalF como su fosforilación y ubiquitinación son idénticas en la cepa silvestre y en las cepas mutantes.

Estos resultados indican que la expresión de PalF no está regulada por el factor de transcripción PacC, ni tampoco lo están las modificaciones postraduccionales que sufre la proteína. A diferencia de *S. cerevisiae*, donde Rim101 actúa como represor de *rim8* (homólogo de *palF*), en este organismo, PacC no parece actuar como represor de la transcripción de *palF*.

## RESULTADOS

### 4.2.3.4. Análisis de la posible implicación de los mecanismos de señalización mediados por calcio en la regulación de las modificaciones postraduccionales de PalF.

Análisis genéticos sugieren que las rutas de señalización mediadas por calcio y la ruta de regulación por el pH ambiental están conectadas. Quisimos saber si los mecanismos de señalización mediados por calcio están implicados en la regulación de las modificaciones postraduccionales de palF. La cepa que expresa PalF::3HA se cruzó con una cepa que contiene las mutaciones *sltA1* y *halA24*, las cuales llevan a una reducción drástica de los niveles de calcio intracelulares e imposibilitan el crecimiento en ausencia de calcio<sup>175</sup>. El cruce fue llevado a cabo por el profesor H.N. Arst en Londres. Analizamos por PCR, con los oligonucleótidos OV41 y OV26, la presencia del gen que expresa PalF etiquetado con 3HA en los segregantes de este cruce (Figura 32). Seleccionamos el segregante número 5 que contiene *palF::3HA*, además de ambas mutaciones, *sltA1* y *halA24*, ya que es el que tiene un fondo genético más parecido a la cepa silvestre utilizada como control.



**Figura 32. Análisis mediante “Western-blot” de PalF::3HA en un mutante *sltA1 halA24*.** Identificación por PCR de las cepas que contienen *palF::3HA*. Los clones positivos han sido enmarcados con un círculo rojo. “Western-blot” con los extractos proteicos de la cepa silvestre (WT) y del mutante *sltA1* y *halA24* seleccionado (número 5). Los extractos proteicos totales provienen de micelio cultivado en medio completo (MCA) ácido con 10 mM CaCl<sub>2</sub> (carriles 1 y 5), después de un cambio al mismo medio carente de calcio durante 2 horas (carriles 2 y 6), seguido de un cambio al mismo medio carente de calcio pero con 100 mM KCl a pH ácido (carriles 3 y 7) ó a pH alcalino (carriles 4 y 8) durante 30 minutos. Realizamos el ensayo con un anticuerpo anti-HA y con 50µg de extracto proteico total.

Esta cepa se cultivó en medio completo ácido con 10mM CaCl<sub>2</sub> toda la noche a 37°C (medio1). Al día siguiente se pasó a un medio carente de calcio y se cultivó durante 2h más (medio 2). Después se dividió el cultivo en 2, a ambas partes se le añadió 100mM de KCl (medio 3) y a una de ellas se le cambió además a pH alcalino (medio 4). Extractos proteicos de micelio de los 4 medios se inmunoprecipitaron y se analizaron mediante “Western-blot”. Podemos observar en la Figura 32 que no hay efecto alguno al eliminar el calcio del

medio tanto en la cepa silvestre (carril 2) como en la que lleva las mutaciones *sltA1* y *halA24* (carril 6). Tampoco se observa que la fosforilación de PalF::3HA después del cambio de pH ácido a pH alcalino, esté afectadas (carriles 4 y 8).

#### 4.3. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA RUTA *RIM* EN *S. cerevisiae*

El trabajo del grupo de A.P. Mitchell ha sido crucial para establecer una relación entre la ruta *RIM* y el pH ambiental en *Saccharomyces cerevisiae*<sup>50</sup>. Al inicio de esta tesis doctoral, varios resultados sugerían que al igual que la ruta homóloga *pal* en *A. nidulans*, la ruta *RIM* está regulada por el pH ambiental. En primer lugar, la proporción de forma activa ó inactiva del factor de transcripción Rim101 varía en función del pH del medio, predominando su forma no procesada en un medio de pH ácido mientras que en un medio neutro o alcalino predomina su forma procesada y activa<sup>53</sup>. En segundo lugar, la falta de cualquiera de los genes de la ruta *RIM* limita el crecimiento de la levadura a pH alcalino, lo que sugiere que la integridad de la ruta es necesaria para su adaptación a pH alcalino<sup>41,50,55</sup>. Por lo tanto, estos resultados sugieren que al igual que la ruta *pal*, la ruta *RIM* esta regulada por el pH ambiental. Sin embargo, ningún estudio previo había demostrado que al igual que en *A. nidulans*, esta ruta se activa de forma rápida en respuesta a un incremento de pH.

En *S. cerevisiae*, existen homólogos para todos los componentes de la ruta *pal*. Dos proteínas, Rim21 y Dfg16, tienen 7 hélices transmembrana y son homólogos de PalH, el putativo sensor de pH en *A. nidulans*. Otra proteína, Rim9, homóloga a PalI, tiene 3 hélices transmembrana. Rim20, al igual que su homólogo PalA, interacciona directamente con el factor de transcripción Rim101, el homólogo de PacC, y esta interacción es requerida para que se produzca su corte proteolítico, probablemente catalizado por la cisteína proteasa Rim13, homólogo de PalB. Rim20 también interacciona con Snf7 (Vps32). Por último, Ygr122w es el putativo homólogo de PalC<sup>38,166</sup>. Finalmente, pero no menos importante, Rim8 es el homólogo de nuestra proteína de interés, PalF. Una vez realizado el estudio de PalF en *A. nidulans*, nos interesó saber si los mecanismos moleculares que regulan esta proteína en respuesta a un cambio de pH están conservados en *S. cerevisiae*. Sin embargo, antes de iniciar este estudio, era necesario asegurarnos que la ruta *RIM*, al igual que la ruta *pal*, se activa de forma rápida en respuesta a un incremento de pH ambiental.

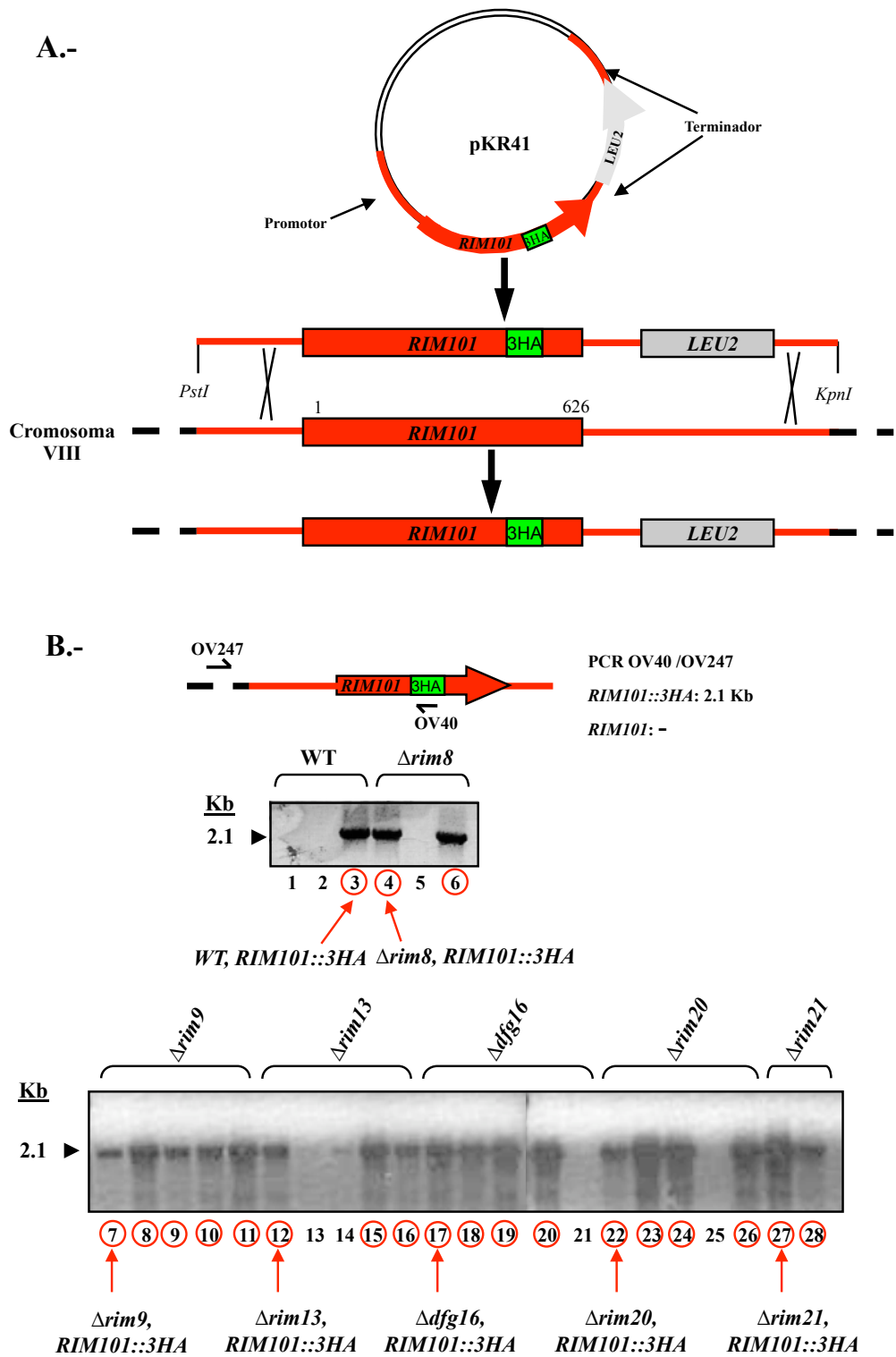
##### 4.3.1. La ruta *RIM* se activa en respuesta a un incremento del pH ambiental.

En la ruta *RIM*, el homólogo de PacC es Rim101. Este factor de transcripción se activa mediante un único paso de procesamiento proteolítico, equivalente al corte señalizador en PacC<sup>28,55</sup>, en el que se eliminan alrededor de 100 residuos de la región C-terminal de Rim101<sup>53,55</sup>.

##### 4.3.1.1 Construcción de cepas que expresan Rim101::3HA

Para comprobar el efecto que tiene un incremento brusco del pH del medio sobre el procesamiento de Rim101, se utilizó el plásmido pKR41<sup>166</sup> para reemplazar *RIM101* por *RIM101::3HA* en una cepa silvestre y en cepas mutantes *rim* ( $\Delta rim21$ ,  $\Delta rim20$ ,  $\Delta rim13$ ,  $\Delta dfg16$ ,  $\Delta rim9$  y  $\Delta rim8$ ) (Figura 33A).

## RESULTADOS



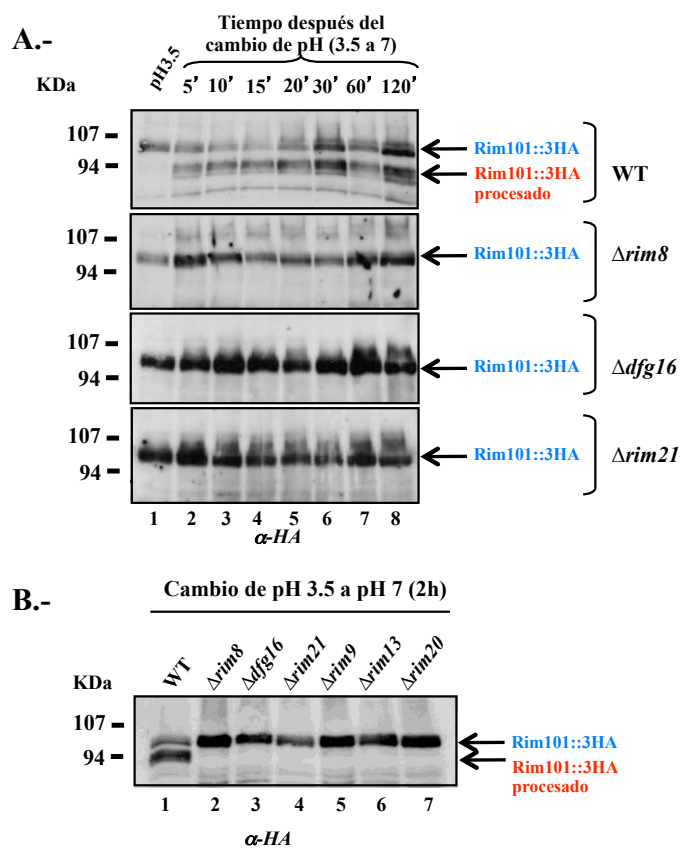
**Figura 33. Reemplazamiento génico de *RIM101* por *RIM101::3HA*. A)** Esquema del reemplazamiento génico de *RIM101* por *RIM101::3HA* (rojo) junto con una copia del gen *LEU2* (gris). La mayoría de los transformantes capaces de crecer en un medio sin leucina han integrado *RIM101::3HA*. **B)** Análisis por PCR de los transformantes obtenidos (los clones que contienen *RIM101::3HA* están rodeados por un círculo rojo).

Este plásmido contiene el gen *RIM101* etiquetado con 3 epítomos de HA seguido por el gen *LEU2* como marcador de selección (ver Materiales y Métodos). Un aspecto importante de esta construcción es que el epítipo 3HA está insertado en la posición 473 de la proteína, por delante del sitio de corte proteolítico, lo que permite la detección mediante “Western-blot” tanto de la forma sin procesar de Rim101 como de la forma procesada. La construcción de estas cepas se llevó a cabo mediante un proceso de reemplazamiento génico en el locus de *RIM101* y los transformantes se seleccionaron en un medio carente del aminoácido L-leucina (Figura 33A).

En la Figura 33B, se muestra el análisis por PCR realizado para varios transformantes (de 3 a 5) de cada cepa con los oligonucleótidos OV247 y OV40. El oligonucleótido OV247 hibrida con el promotor de *RIM101*, por delante de la construcción utilizada para el reemplazamiento génico, lo que nos asegura que la construcción ha sido insertada en el locus correcto. El oligonucleótido OV40 hibrida con el epítipo 3HA. Se obtiene así, en el caso de reemplazamiento génico, una banda de 2.1 Kb. En la mayoría de los casos, se obtuvo más de un transformante positivo (enmarcados en un círculo rojo). Seleccionamos un transformante positivo de cada mutante y lo guardamos en la colección del laboratorio con la siguiente nomenclatura: OVY24 (WT, *RIM101::3HA*), OVY25 ( $\Delta rim8$ , *RIM101::3HA*), OVY39 ( $\Delta rim9$ , *RIM101::3HA*), OVY40 ( $\Delta rim13$ , *RIM101::3HA*), OVY41 ( $\Delta dfg16$ , *RIM101::3HA*), OVY42 ( $\Delta rim20$ , *RIM101::3HA*) y OVY43 ( $\Delta rim21$ , *RIM101::3HA*).

#### 4.3.1.2. Rim101 se procesa en respuesta a un incremento de pH ambiental.

Las cepas silvestre (OVY24) y mutantes (OVY25, OVY39, OVY40, OVY41, OVY42 y OVY43) que expresan *Rim101::3HA*, fueron analizadas mediante “Western-blot” con un anticuerpo anti-HA (Figura 34).



**Figura 34. Análisis del procesamiento de Rim101 en respuesta a un incremento de pH ambiental.** A) Cinética de procesamiento de *Rim101::3HA* en una cepa silvestre (WT) y en los mutantes de la ruta  $\Delta rim8$ ,  $\Delta dfg16$  y  $\Delta rim21$  al realizar un cambio de pH de 3,5 a 7. Los tiempos a los que se han recogido los cultivos después del cambio de pH son t= 5, 10, 15, 20, 30, 60 y 120 minutos. B) Mismo análisis con todos los mutantes después de un cambio de pH de 3,5 a 7, recogiendo muestras del cultivo 2 horas después del cambio de pH. Los tamaños de las bandas se indican en kDa. Se ha utilizado un anticuerpo monoclonal anti-HA.

## RESULTADOS

Analizamos el procesamiento de Rim101::3HA después de un cambio brusco del pH ambiental de 3,5 a 7. Para estudiar la cinética de procesamiento, se recogieron muestras de los cultivos a distintos tiempos después del cambio de pH y se prepararon extractos proteicos totales para su posterior análisis mediante “Western-blot”. En el carril 1 de la Figura 34A, observamos que Rim101 no se procesa a pH 3,5 ni en la cepa silvestre (WT) ni en ninguno de las cepas mutantes ( $\Delta rim8$ ,  $\Delta dfg16$  y  $\Delta rim21$ ). Los resultados obtenidos para la cepa silvestre en el carril 2 del primer “Western-blot” de la Figura 34A demuestran que 5 minutos después de hacer el cambio de pH, ya existe la forma procesada de Rim101, lo que significa que la respuesta al cambio de pH es muy rápida. Cuando analizamos el comportamiento de Rim101 en las distintas cepas mutantes en las cuales los genes *RIM8*, *RIM21* y *DFG16* han sido eliminados, observamos que no se produce el procesamiento del factor de transcripción, al igual que lo que se observa con PacC en mutantes *pal* en *A. nidulans*.

En la Figura 34B se muestra el mismo experimento de cambio de pH de 3,5 a 7, pero recogiendo muestras del cultivo 2 horas después del cambio de pH. En este “Western-blot”, comprobamos que tampoco hay procesamiento de Rim101 en los mutantes de la ruta  $\Delta rim9$ ,  $\Delta rim13$  y  $\Delta rim20$ .

Estos resultados completan los estudios realizados por otros grupos e indican que la respuesta a un cambio de pH es muy rápida y que cualquier componente de la ruta *RIM* es necesario para que la señal se transmita.

### 4.3.2. Estudio del homólogo de PalF en *Saccharomyces cerevisiae*, Rim8.

Una vez demostrado que Rim101 se procesa rápidamente en respuesta a un cambio brusco de pH, al igual que PacC en *A. nidulans*, nos propusimos analizar el comportamiento del homólogo de PalF, Rim8. Rim8 es una proteína con 543 residuos que contiene, al igual que PalF, 2 dominios conservados arrestina N-terminal y arrestina C-terminal.

#### 4.3.2.1. Detección de Rim8::3HA mediante ensayos de “Western-blot”.

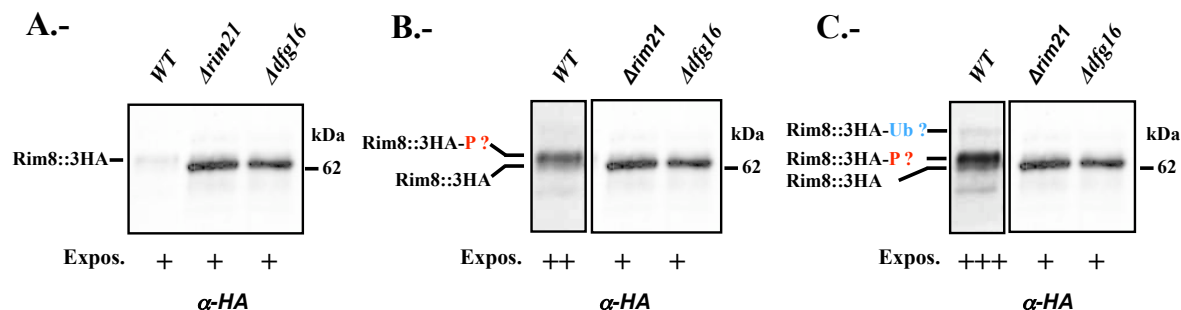
Para poder estudiar Rim8, se construyó un plásmido centromérico (derivado de pRS313, ver Materiales y Métodos) que permite la expresión de Rim8 etiquetado con 3 copias del epítipo HA, bajo su propio promotor (pO81). La construcción de este plásmido se detalla en la sección 3.3.3 de Materiales y Métodos. Al igual que para PalF, el epítipo 3HA ha sido introducido en la región de la proteína correspondiente al lazo que se encuentra entre las láminas beta IX y X en el dominio arrestina N-terminal (Figura 25).

Las cepas silvestre y mutantes  $\Delta rim21$  y  $\Delta dfg16$  (OVY29, OYV35 Y OYV37, respectivamente) se transformaron con pO81. Al ser pO81 un vector centromérico, los transformantes obtenidos en un medio selectivo contienen una ó pocas copias de este plásmido. Esto, junto con el hecho que Rim8::3HA esta expresado bajo su propio promotor, hace que los niveles de expresión de la proteína etiquetada sean cercanos a los de la proteína endógena.

Para detectar Rim8::3HA mediante “Western-blot”, se prepararon inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA de los extractos proteicos de las distintas cepas cultivadas en medio mínimo (SD). A todos los cultivos se les realizó un cambio de pH de 3,5 a 7 durante 30 minutos antes de recoger las muestras.

En la Figura 35A, observamos que existe una regulación muy marcada de la expresión de Rim8::3HA por la ruta *RIM*, ya que hay más cantidad de esta proteína cuando la ruta está bloqueada como en el caso de los mutantes  $\Delta rim21$  y  $\Delta dfg16$ . Este resultado es consistente con la regulación de la transcripción de *RIM8* por la

ruta *RIM*, que había sido previamente demostrada por otro grupo mediante “microarrays” y “Northern-blot”<sup>59</sup>. Esta regulación se debe probablemente a la presencia de sitios de unión de Rim101 en el promotor de *RIM8*, actuando éste como represor.



**Figura 35. Análisis mediante “Western-blot” de Rim8::3HA.** “Western-blot” en el que se revela Rim8::3HA en una cepa silvestre (WT) y en los mutantes *Δrim21* y *Δdfg16*. Los inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA de extractos proteicos totales provienen de transformantes de las cepas OVY29 (WT), OVY35 (*Δrim21*) y OVY37 (*Δdfg16*) con p081 (Rim8::3HA), cultivados en medio mínimo (SD) y recogidos después de un cambio de pH 3,5 a pH 7 durante 30 minutos. En todos los casos, se inmunoprecipitan 200μg del extracto proteico y se revela con un anticuerpo anti-HA. **A)** Exposición corta **B)** y **C)** Mismo “Western-blot” que en el panel A con una sobreexposición mediana (**B**) ó larga (**C**) de la parte del gel correspondiente al extracto procedente de la cepa silvestre (WT).

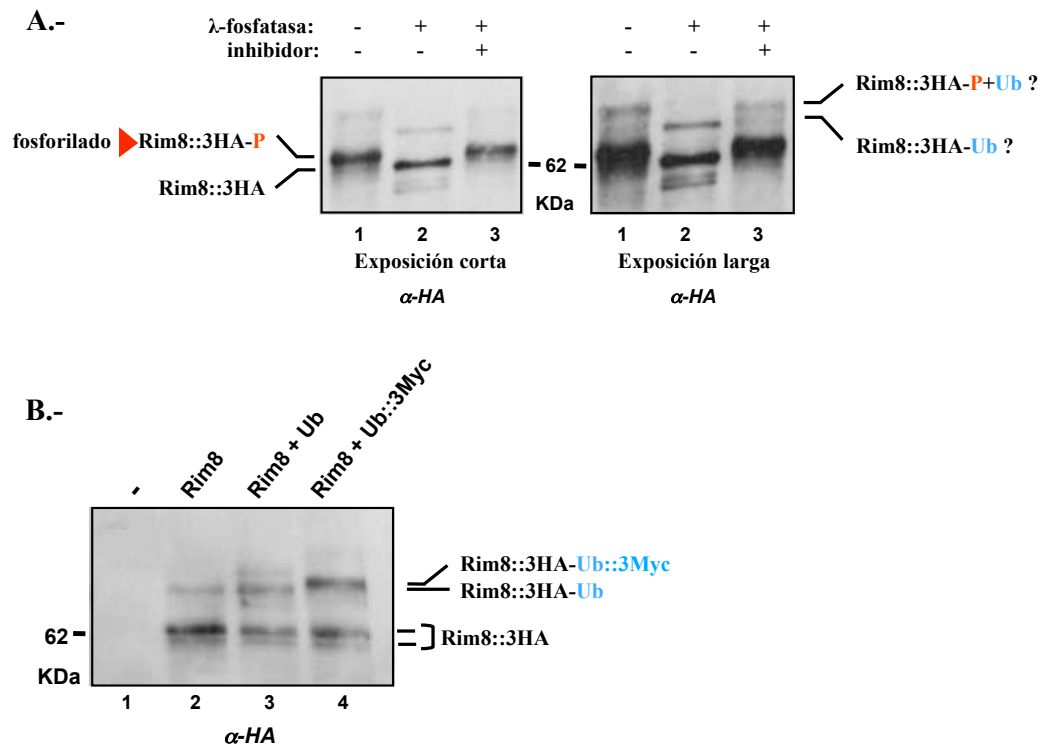
En la Figura 35B, se muestra el mismo “Western-blot” que en la Figura anterior, pero con una sobreexposición de la parte del gel correspondiente a la detección de Rim8 en un fondo silvestre (Expos.++). De esta forma, conseguimos ver que la banda correspondiente a Rim8::3HA en un fondo silvestre es un doblete en el cual la forma de mayor movilidad electroforética corresponde a la única banda detectada en los mutantes *Δrim21* y *Δdfg16*. Tomando en cuenta los datos previos obtenidos en *A. nidulans*, este resultado sugiere que la banda de menor movilidad electroforética corresponde a la forma fosforilada de Rim8 y que, al igual que PalF, Rim8 se fosforila de forma dependiente de los putativos sensores de pH, en este caso Rim21 y Dfg16.

Finalmente, después de una exposición aun más prolongada (Expos.+++), detectamos una tercera banda de menor movilidad en el fondo silvestre (WT) (Figura 35C). Esta banda, que también es detectable en los mutantes *Δrim21* y *Δdfg16* en exposiciones más prolongadas, podría ser debida a la ubiquitinación de la proteína, también detectada con PalF en *A. nidulans*.

#### 4.3.2.2. Fosforilación de Rim8::3HA.

Los resultados obtenidos sugieren que Rim8 se fosforila al igual que PalF y que el doblete detectado mediante “Western-blot” en la cepa silvestre se debe a esta modificación postraducciona. Comprobamos, mediante un ensayo de defosforilación en el que tratamos con λ-fosfatasa inmunoprecipitados de Rim8::3HA (ver Materiales y Métodos), que la banda superior se debe en efecto a la fosforilación de la proteína (carril 2 de la Figura 36A). Vemos en el carril 3 que al tratar el inmunoprecipitado con un inhibidor de la fosfatasa, no se produce la defosforilación de Rim8::3HA. Se puede observar en una sobreexposición del mismo “Western-blot” que la banda superior o de menor movilidad que creemos podría ser debida a la ubiquitinación de la proteína, también cambia de movilidad al defosforilarse Rim8::3HA, lo que podría indicar que esta banda corresponde a Rim8 ubiquitinado y fosforilado.

## RESULTADOS



**Figura 36. Caracterización de las modificaciones postraduccionales de Rim8.** **A)** “Western-blot” en el que se muestra el cambio de movilidad electroforética de Rim8::3HA después del tratamiento con lambda-fosfatasa. El ensayo ha sido realizado con inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-HA de un extracto proteico total de la cepa OVY31 (*Arim8*) transformada con el plásmido p081 (Rim8::3HA): control sin fosfatasa (carril 1), muestra con fosfatasa (carril 2), muestra con fosfatasa y 10 mM Vanadato sódico (carril 3). **B)** “Western-blot” de la cepa OVY31 (*Arim8*) transformada con el plásmido p081 (Rim8::3HA) (carril 2), cotransformada con p081 y Yep96 (pCUP1-Ubiquitina) (carril 3), ó cotransformada con p081 y Yep96-3MYC (pCUP1-Ubiquitina::3MYC) (carril 4). Los transformantes han sido cultivado en medio mínimo en presencia de 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> para inducir el promotor *pCUP1*. En todos los casos, se inmunoprecipitan 200 $\mu$ g del extracto proteico y se revela con un anticuerpo anti-HA.

### 4.3.2.3. Ubiquitinación de Rim8::HA.

Una vez confirmada la fosforilación de Rim8, analizamos su posible ubiquitinación. Para comprobar que la banda de menor movilidad detectada mediante “Western-blot” corresponde a la ubiquitinación de la proteína, se co-transformó una cepa silvestre con el plásmido que permite la expresión de Rim8::3HA (p081) y otro que permite la sobreexpresión, bajo el control del promotor *pCUP1* inducible por cobre, de la ubiquitina (Yep96) ó de la ubiquitina etiquetada con 3 copias del epítipo MYC (Yep96-3MYC). En el carril 2 de la Figura 36 B, comprobamos de nuevo cómo Rim8::3HA se resuelve en 3 bandas, las dos de mayor movilidad formando un doblete que sabemos se debe a la fosforilación de la proteína. En el carril 3, se puede observar que la sobreexpresión de la ubiquitina provoca un ligero incremento en la fracción correspondiente a la forma de menor movilidad (en relación con las de mayor movilidad), lo que es consistente con la posibilidad de que esta banda corresponda a la proteína ubiquitinada. Por último y más importante, en el carril 4, vemos que al sobreexpresar ubiquitina etiquetada con 3 epítopos MYC, la banda de menor movilidad migra ligeramente por encima de lo que le corresponde. Este cambio es compatible con la presencia de los 40 aminoácidos adicionales de este epítipo fusionado a la ubiquitina, lo que indica que esta banda se debe efectivamente a ubiquitinación de Rim8.



Como conclusión de este último apartado, podemos decir que al igual que su homólogo PalF en *A. nidulans*, Rim8 se fosforila y ubiquitina y que la fosforilación requiere la presencia de los putativos sensores de pH, en este caso Rim21 y Dfg16. Estos resultados confirman la conservación de la ruta de señalización por pH ambiental en los dos organismos estudiados. Podemos así definir un modelo para la ruta de señalización por pH ambiental en *S. cerevisiae*, en el que la proteína Rim8 se regula, al igual que su homólogo en *A. nidulans*, mediante fosforilación y ubiquitinación. La homología de PalF/Rim8 con las  $\beta$ -arrestinas de mamífero, junto con la conservación de los mecanismos moleculares implicados en su regulación (fosforilación y ubiquitinación), sugieren una posible función de estas proteínas como adaptadores endocíticos.



## **DISCUSIÓN**



5. DISCUSIÓN

Al inicio de esta tesis doctoral, el modelo propuesto para la ruta de señalización por pH ambiental en hongos era tal y como se muestra en la Figura 37<sup>33</sup>. Aunque se desconocía el orden de actuación de los componentes de esta ruta, se sospechaba que PalI y palH se localizarían en la membrana plasmática actuando como posibles sensores de la señal, ya que ambas contienen 3 y 7 hélices transmembrana respectivamente. En este modelo, los otros componentes de la ruta de señalización actuarían corriente abajo de estas dos proteínas. En particular, la cisteína proteasa PalB, podría ser responsable del primer corte proteolítico en el factor de transcripción PacC, necesario para su activación y translocación al núcleo, mientras que PalA actuaría como proteína adaptadora entre el factor de transcripción y Vps32, un componente de maquinaria endocítica ESCRT asociada a la membrana del endosoma.

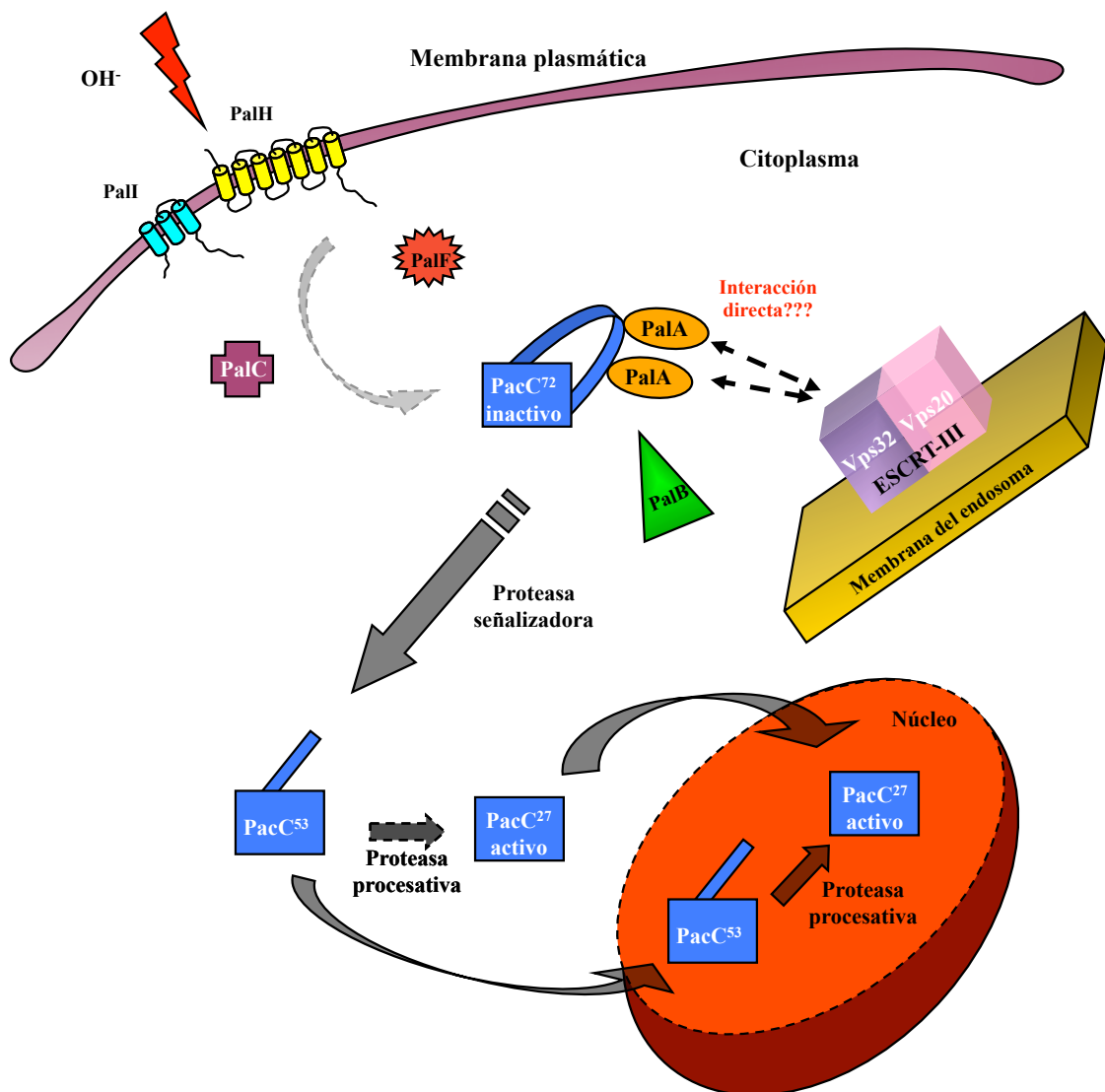


Figura 37. Modelo de regulación de la ruta de señalización por pH ambiental en el hongo *A. nidulans*. Ver descripción en el texto.

### 5.1. ANÁLISIS DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR PH AMBIENTAL EN HONGOS.

Nuestro interés se ha centrado en el estudio de esta ruta de señalización a nivel molecular. Este estudio ha sido llevado a cabo principalmente en el hongo *A. nidulans*, aunque ciertos aspectos de la ruta se han estudiado también en la levadura *S. cerevisiae*. Estos dos organismos han sido los más utilizados para estudiar la ruta de señalización por pH ambiental, aunque algunos estudios han sido llevados a cabo en otros hongos como por ejemplo *C. albicans* ó *Y. lipolytica*.

En ambos organismos, *A. nidulans* y *S. cerevisiae*, la ruta de señalización por pH ambiental está conservada. Existen homólogos para cada uno de los componentes de la ruta *pal* en *A. nidulans* en la ruta *RIM* de *S. cerevisiae*. PalH en *A. nidulans* tiene dos homólogos en *S. cerevisiae*, Rim21 y Dfg16. PalI tiene un homólogo, Rim9 y los homólogos de PalA, PalB, PalF y PacC son respectivamente Rim20, Rim13, Rim8 y Rim101. Recientemente se ha identificado un posible homólogo para PalC en *S. cerevisiae*, Ygr122w. Sin embargo, existen notables diferencias entre ambas rutas. En *A. nidulans*, PacC puede actuar como activador o represor transcripcional, mientras que en *S. cerevisiae*, Rim101 actúa únicamente como represor. Otra diferencia importante es que el procesamiento de PacC se lleva a cabo mediante 2 cortes proteolíticos sucesivos, un primer corte dependiente de la señal de pH ambiental y catalizado por la proteasa señalizadora, supuestamente la cisteína proteasa PalB, y un segundo corte independiente de la señal, realizado por una proteasa procesativa, posiblemente el proteosoma. En cambio, la activación de Rim101 en *S. cerevisiae* requiere un sólo corte proteolítico, posiblemente catalizado por el homólogo de PalB, Rim13.

El trabajo del grupo de A.P. Mitchell ha sido crucial para establecer una relación entre esta ruta de señalización y el pH ambiental en *S. cerevisiae*<sup>50</sup>. Al inicio de esta tesis doctoral, existían ciertas evidencias de que la ruta *RIM* media la respuesta a cambios de pH ambiental, al igual que la ruta *pal* en *A. nidulans*. La proporción de forma procesada o sin procesar de Rim101 varía dependiendo del pH del medio, predominando la forma no procesada en un medio de pH ácido mientras que en un medio neutro ó alcalino predomina la forma procesada de la proteína<sup>53</sup>.

Con el objetivo de confirmar el papel determinante del pH ambiental en la activación de la ruta *RIM* en *S. cerevisiae*, analizamos, en primer lugar, el procesamiento de Rim101 en respuesta a un incremento brusco de pH. Para ello, analizamos el comportamiento del factor de transcripción al pasar de un medio con pH ácido (pH 3,5) a un medio con pH ligeramente alcalino (pH 7,5). Nuestros resultados indican que Rim101 se procesa de manera inmediata en respuesta a este incremento del pH del medio. Este resultado concuerda con lo que ha sido descrito en el hongo *A. nidulans*, ya que PacC se procesa también de manera rápida en respuesta a un incremento del pH ambiental<sup>28</sup>.

Nuestro segundo objetivo fue averiguar si todos los componentes de la ruta *RIM* son esenciales para la transducción de la señal de pH. En *S. cerevisiae*, los mutantes *rim* no tienen un fenotipo muy marcado, a diferencia de los mutantes *pal* en *A. nidulans*, por lo que no estaba tan claro que todos los componentes de esta ruta fueran esenciales para la transducción de la señal. Los resultados indican que el crecimiento a pH alcalino de los mutantes *rim* esta afectado, lo que sugiere que la integridad de la ruta es necesaria para la transmisión de la señal<sup>41,50,55</sup>. Para comprobarlo, se analizó el procesamiento de Rim101 en los distintos mutantes *rim*. Los resultados obtenidos indican que la ausencia de cualquiera de los genes de la ruta *RIM* bloquea el procesamiento de Rim101 después de un incremento de pH. En particular, la ausencia de *RIM9* provoca un bloqueo total de la

ruta, a diferencia de lo que ocurre en *A. nidulans*, donde la inactivación de *palI* sólo tiene un efecto parcial sobre la transducción de la señal de pH. Este hecho resulta sorprendente ya que ambas proteínas son homólogas. Un estudio más en profundidad de la función de esta proteína en la transducción de la señal de pH sería necesario para poder explicar esta diferencia.

Nuestros resultados confirman, por lo tanto, que el procesamiento del factor de transcripción Rim101 es dependiente de la integridad de todos los componentes de la ruta *RIM* y demuestran que esta ruta se activa en respuesta a un incremento de pH ambiental de forma inmediata.

Gran parte de nuestro interés por la ruta de señalización por pH ambiental en hongos, proviene de la aparente relación que mantiene ésta ruta con la vía endocítica. Al iniciar este trabajo, existían indicios de que la conexión entre ambas rutas podría efectuarse a dos niveles, en primer lugar a nivel de Rim20/PalA que interacciona con Snf7/Vps32, uno de los componentes de la maquinaria endocítica ESCRT, y en segundo lugar a nivel de Rim8/PalF, una proteína relacionada con las arrestinas que actúan como adaptadores endocíticos en mamíferos.

## **5.2. CONEXIÓN ENTRE LA VÍA ENDOCÍTICA Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL: EL COMPLEJO ESCRT-III.**

La posible implicación de la maquinaria endocítica ESCRT en la ruta de señalización por pH ambiental en hongos ya fue sugerida antes de iniciar esta tesis doctoral por varios grupos incluido el nuestro <sup>40,55</sup>. Hemos analizado la conexión entre la maquinaria ESCRT y la ruta de señalización por pH ambiental mediante dos abordajes. Por una parte, hemos caracterizado la interacción entre una proteína de la ruta *pal*, PalA y otra del complejo ESCRT-III, Vps32. Por otra parte, hemos investigado el efecto sobre la ruta de un mutante dominante negativo de *vps4* que bloquea la disociación de los complejos ESCRTs en otros organismos <sup>110</sup>.

### **5.2.1 Interacción directa entre PalA y Vps32 en *Aspergillus nidulans* y entre sus homólogos en otros organismos.**

En un amplio estudio genético de doble-híbrido en la levadura *S. cerevisiae*, se descubrió que la proteína Rim20 (homólogo de PalA de *A. nidulans*) interacciona con Snf7 (Vps32) y que a su vez Snf7 interacciona con la proteína Rim13 (homólogo de PalB de *A. nidulans*) <sup>156</sup>. El grupo de A.P. Mitchell demostró que Rim20 interacciona también con Rim101 (homólogo de PacC de *A. nidulans*) y sugirió que Snf7 podría actuar como andamiaje para acercar la putativa cisteína proteasa Rim13 al complejo formado por Rim20 y el factor de transcripción Rim101 y así poderse producir el corte proteolítico que activa Rim101 <sup>55</sup>.

Nuestro grupo realizó estudios de doble-híbrido previos en los que se comprobó que las interacciones detectadas en *S. cerevisiae* están conservadas en *A. nidulans*. PalA interacciona con motivos YPXL en el factor de transcripción PacC y con el componente de la maquinaria endocítica ESCRT III, Vps32 <sup>40</sup>. Se conseguía así establecer la primera conexión entre la ruta de señalización por pH ambiental y la vía endocítica en el hongo *A. nidulans*. Se demostró posteriormente que estas interacciones están conservadas a nivel evolutivo ya que el homólogo humano de PalA, Alix/AIP1, interacciona tanto con Vps32 como con el motivo YPXL <sup>40</sup>. Dado que Vps32 es un componente del complejo multiproteico ESCRT-III, estos datos nos llevaron a preguntarnos si la interacción detectada entre PalA/Rim20 y Vps32/Snf7 era directa, para lo cual decidimos llevar a cabo ensayos de unión *in vitro*.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que la interacción detectada entre las proteínas Vps32 y PalA en el hongo *A. nidulans* es directa. Así mismo, demostramos que la interacción también es directa entre los homólogos de estas proteínas en *S. cerevisiae*. Estos resultados demuestran una conexión directa entre la maquinaria ESCRT implicada en la vía endocítica y la ruta de señalización por pH ambiental. Una vez obtenidos estos resultados, nos interesó identificar las regiones de PalA responsables de la interacción con Vps32. Nuestros resultados indican que la región de PalA que interacciona con Vps32 es la región N-terminal que contiene el dominio Bro1 de la proteína.

Hemos demostrado que esta interacción directa se detecta también entre las proteínas con dominio Bro1, Rim20 y Bro1, y Snf7 (Vps32) en *S. cerevisiae*, y que EhADH112, una proteína con dominio Bro1 en la ameba *E. histolytica* también interacciona de forma directa con el homólogo de Vps32 en este organismo. EhADH112 tiene una función esencial en el proceso de fagocitosis y es una posible diana de futuros tratamientos de las amebiasis <sup>107</sup>. Hemos identificado la región de EhADH112 que interacciona con EhVps32 y hemos demostrado que la región interactiva se encuentra en la parte N-terminal de EhADH112, coincidiendo de nuevo con el dominio Bro1 presente en esta proteína. Estos resultados forman parte de un estudio realizado en colaboración con el grupo de la Dra. E. Orozco del CINVESTAV en Méjico, en el cual se ha demostrado, mediante la utilización de un mutante dominante negativo EhVps4E211Q, que la maquinaria ESCRT es esencial para la fagocitosis en *Entamoeba histolytica* <sup>176,177</sup>.

Por otra parte, el grupo de M.A. Peñalva ha demostrado, mediante ensayos de doble-híbrido e interacción *in vitro*, que la proteína PalC, implicada en la ruta de señalización por pH ambiental y que también contiene un dominio Bro1, interacciona igualmente con Vps32 <sup>38,178</sup>. Todos estos resultados que indican que una de las características de las proteínas con dominio Bro1 es interaccionar con el componente Snf7 (Vps32) del complejo ESCRT-III, son consistentes con datos estructurales obtenidos posteriormente, que muestran que esta interacción se produce a través de una región hidrofóbica en el dominio Bro1 <sup>179</sup>.

### 5.2.2. Efecto del mutante dominante negativo Vps4<sup>E232Q</sup> sobre la ruta de señalización por pH ambiental en *A. nidulans*.

Para poder investigar la posible implicación de la maquinaria endocítica ESCRT en la transducción de la señal de pH ambiental en *A. nidulans*, construimos un mutante dominante negativo *vps4*<sup>E232Q</sup>. Vps4 es una ATPasa de tipo AAA implicada en el transporte de cargos endocíticos desde el compartimento prevacuolar a la vacuola y necesaria para la disociación de los complejos ESCRT una vez este proceso haya terminado <sup>109</sup>. Snf7 (Vps32) pertenece al complejo ESCRT-III. Inicialmente se intentó crear un mutante nulo del gen *vps32* en nuestro laboratorio. Sin embargo, a diferencia de lo que se ha observado en *S. cerevisiae*, este gen parece esencial en *A. nidulans*. En *Y. lipolytica*, tampoco han podido obtener un mutante nulo de este gen, lo que sugiere que también tiene una función esencial a diferencia de lo que ocurre en la levadura *S. cerevisiae* <sup>180</sup>. Finalmente, un estudio reciente ha confirmado el carácter esencial de los genes que codifican para componentes de la maquinaria ESCRT en *A. nidulans* <sup>181</sup>.

Dada la aparente letalidad de la mutación  $\Delta vps32$ , decidimos utilizar un mutante dominante negativo en *vps4* que bloquea el funcionamiento de la maquinaria endocítica ESCRT. En un estudio previo en *S. cerevisiae*, se utilizaron dos tipos de mutantes de *vps4*, en uno la mutación no permite la unión de ATP a la proteína (Vps4<sup>K179A</sup>), y en el otro la molécula de ATP puede unirse a Vps4 pero ésta no puede ser hidrolizada (Vps4<sup>E233Q</sup>)



<sup>109</sup>. En ambos casos, observaron que la sobreexpresión del gen mutado produce un efecto similar al observado en un mutante que carece de la proteína.

Nuestros resultados indican que la sobreexpresión de Vps4<sup>E232Q</sup> en *A. nidulans* inhibe el crecimiento del hongo, lo que es consistente con la aparente letalidad de  $\Delta vps32$ . Sin embargo, la sobreexpresión de Vps4<sup>E232Q</sup> no bloquea el procesamiento proteolítico de PacC en respuesta a un incremento del pH ambiental. Tampoco hemos observado el resultado opuesto, es decir, que esta mutación active la ruta de forma constitutiva. Este último resultado es más sorprendente a la vista de resultados obtenidos en *S. cerevisiae* y publicados posteriormente. En *S. cerevisiae*, mutaciones de pérdida de función en *VPS2*, *VPS24* y en menor medida *VPS4*, causan cierto grado de constitutividad en la ruta de transducción de pH <sup>182</sup>. Dado que estos mutantes acumulan el subcomplejo Vps20-Snf7 de ESCRT-III asociado a la membrana del endosoma <sup>99,110</sup>, se ha propuesto que el subcomplejo Vps24-Vps2 de ESCRT-III, implicado en el reclutamiento de Vps4, compite con los componentes de la ruta de señalización por pH ambiental, Rim20 y Rim13, por unirse al subcomplejo Vps20-Snf7 de ESCRT-III. En el caso de los mutantes  $\Delta vps2$  y  $\Delta vps24$  y en menor medida  $\Delta vps4$ , la mayor disponibilidad del subcomplejo Vps20-Snf7 para la unión de Rim20 y Rim13 sería la responsable de la activación de la ruta Rim.

La aparente ausencia de desregulación de la ruta de señalización por pH ambiental cuando se sobreexpresa Vps4<sup>E232Q</sup> en *A. nidulans* podría explicarse de la siguiente forma. En primer lugar, hemos utilizado un mutante dominante negativo y por lo tanto la proteína, aunque inactiva, está presente, mientras que estudios en *S. cerevisiae* utilizaron un mutante nulo en el que la proteína está ausente. En nuestro caso, la unión de Vps4<sup>E232Q</sup> a través de su dominio MIT a ESCRT-III, podría impedir la unión de PalB a este complejo, ya que un estudio reciente ha demostrado que PalB contiene también en su región N-terminal un dominio MIT que media su interacción con el motivo MIM de Vps24, un componente de ESCRT-III implicado en el reclutamiento de Vps4 <sup>183</sup>. El no reclutamiento de PalB no permitiría el procesamiento de PacC en condiciones en las cuales la ruta no ha sido activada.

La aparente letalidad de los mutantes *vps* clase E en *A. nidulans* no nos ha permitido confirmar esta hipótesis. Sin embargo, los resultados del estudio de la interacción entre PalA y Vps32 indican claramente que la ruta de señalización por pH ambiental está directamente conectada con la maquinaria endocítica ESCRT. Esta conexión fue confirmada por estudios llevados a cabo en *S. cerevisiae* <sup>182,184</sup> y *Y. lipolytica* <sup>180</sup>. Sus resultados prueban que la mayoría de los componentes de los complejos ESCRTs son necesarios para el procesamiento de Rim101 y como consecuencia para la señalización por pH ambiental, excepto Vps27 y los componentes periféricos de ESCRT-III: Vps2, Vps24, Vps4, Bro1 y Doa4. En *S. cerevisiae*, Snf7 y Vps20 son las dos proteínas de ESCRT-III que se requieren para el procesamiento de Rim101 <sup>182</sup>. Estas proteínas se asocian con la membrana del endosoma, lo que sugiere que Vps20-Snf7 sirve de plataforma para reclutar otras proteínas. De hecho, estos datos apoyan la existencia de dos complejos cimentados sobre el mismo núcleo. Por un lado, un complejo formado por Vps20 y Snf7, implicado en la ruta de los MVBs (junto con Vps2, Vps24, Vps4, Bro1 y Doa4), y por otro lado un complejo formado por Vps20 y Snf7, dedicado a la señalización por pH ambiental (junto con Rim13/PalB y las proteínas con dominio Bro1 Rim20/PalA y Ygr122W/PalC). Finalmente, un estudio reciente en *A. nidulans* ha confirmado los resultados obtenidos en *S. cerevisiae* y ha demostrado que la mayoría de los componentes de los complejos ESCRTs son también necesarios para la transducción de la señal de pH en este hongo <sup>181</sup>.

### 5.3. PalA COMO ANDAMIAJE PARA LA PROTEASA PROCESATIVA PalB.

Una vez llevado a cabo el estudio de la interacción de PalA con la maquinaria ESCRT, investigamos la posible asociación de esta proteína con otros componentes de la ruta de señalización por pH ambiental. Un amplio estudio genético de doble-híbrido llevado a cabo en *S. cerevisiae*, demostró que Rim20 interacciona con Snf7 y que éste a su vez interacciona con Rim13, la cisteína proteasa supuestamente requerida para el corte procesativo de Rim101<sup>156</sup>. Se propuso que Rim20 pueda servir como parte de un andamiaje que acercaría Rim13, la proteasa, al factor de transcripción Rim101 para que pudiese producirse el corte proteolítico<sup>55</sup>. En el hongo *A. nidulans*, PacC interacciona con PalA *in vitro* a través de dos motivos YPXL/I que se encuentran a ambos lados del sitio de corte proteolítico en PacC<sup>40</sup>. Teniendo presente la alta homología de las rutas en ambos organismos y habiéndose detectado interacción *in vitro* entre PalA y PacC, nuestro interés se centró en detectar la asociación *in vivo* de estas distintas proteínas (PalA, PalB y PacC) para poder estudiar su posible regulación por el pH ambiental. Para ello, construimos cepas con PalA y PalB etiquetados con triple epítomos HA ó MYC, y posteriormente realizamos ensayos de coimmunoprecipitación.

Los resultados obtenidos no nos permitieron detectar la asociación “*in vivo*” de PalA con PalB ó PacC. Consideramos la posibilidad de que este resultado negativo sea debido al aspecto transitorio de esta interacción. La unión de PalA y PalB a PacC en respuesta a la señal de pH, daría lugar al corte proteolítico en PacC de forma inmediata, liberándose el complejo rápidamente. Con el fin de estabilizar este complejo y poder detectar la interacción entre estas proteínas *in vivo*, construimos una cepa que además de expresar PalA y PalB etiquetadas con epítomos, contiene la mutación *pacC209*. Esta mutación en *pacC* evita que el factor de transcripción pueda ser procesado, con lo cual al activarse la ruta en respuesta a un incremento de pH, se formaría el complejo para procesar PacC que no podría disociarse al no poder ser procesado por PalB. Los resultados que obtuvimos fueron los mismos que al utilizar las cepas sin mutación en *pacC* y no fuimos capaces de detectar éstas interacciones *in vivo* aunque resultados previos demuestran claramente que PalA y PacC interaccionan *in vitro*.

La imposibilidad de coimmunoprecipitar este complejo podría ser debida a su insolubilidad. Nuestros resultados indican que PalA interacciona con la proteína Vps32 a través de su dominio Bro1. Por otro lado, un estudio reciente indica que PalB interacciona con Vps24 a través de su dominio MIT<sup>183</sup>. Si esto es así, el complejo debería localizarse asociado a la membrana del endosoma ya que Vps32 y Vps24 pertenecen a la maquinaria ESCRT, en concreto a ESCRT-III que se ensambla y se asocia a la membrana del endosoma a través de Vps20. Esto podría explicar la dificultad para extraer este complejo en una fracción soluble. Un posible abordaje alternativo sería estudiar la localización subcelular de estas tres proteínas para ver si colocalizan en un mismo lugar en la célula cuando la ruta se activa en respuesta a la señal de pH.

### 5.4. POSIBLE CONEXIÓN ENTRE LA VÍA ENDOCÍTICA Y LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN POR pH AMBIENTAL A NIVEL DE LA PROTEÍNA PalF/Rim8.

Un segundo posible punto de conexión entre la vía endocítica y la ruta de señalización por pH ambiental es la proteína PalF en *A. nidulans* ó su homólogo Rim8 en *S. cerevisiae*. PalF/Rim8 es una proteína relacionada con las arrestinas de mamíferos y de hecho la primera proteína de esta familia identificada fuera de metazoos. Dado el papel de las arrestinas como adaptadores endocíticos en mamíferos, hemos considerado la posibilidad de que PalF/Rim8 sea también un punto de conexión con la vía endocítica.

#### 5.4.1. PalF/Rim8, una proteína homóloga a las arrestinas de mamíferos.

El análisis detallado de la secuencia de PalF/Rim8 permitió la detección de bloques de secuencias conservados que corresponden a los principales motivos estructurales de las arrestinas identificados por cristalografía. Además, el análisis por doble-híbrido de las posibles interacciones entre los productos de los distintos genes *pal* llevó a la detección de una fuerte interacción entre PalF y los dos extremos de la cola citoplásmica C-terminal de la proteína 7TM y putativo sensor de pH, PalH, como ya se comentó en la introducción. La interacción con un receptor de 7 hélices transmembrana es una de las características principales de las arrestinas, que al interactuar con los dominios citoplásmicos de estos receptores, bloquean la señal mediada por proteínas G a la vez que promueven el reciclamiento ó la degradación del receptor vía endocitosis. Las arrestinas, además, están implicadas en la activación de un gran número de rutas de señalización, lo que las convierte en unas proteínas muy versátiles.

#### 5.4.2. Regulación de PalF/Rim8.

Las  $\beta$ -arrestinas de mamíferos son proteínas reguladas mediante fosforilación y ubiquitinación. Decidimos, por lo tanto, iniciar el estudio de PalF analizando su movilidad electroforética y sus posibles modificaciones postraduccionales. Para este estudio, en primer lugar, etiquetamos PalF con 3 copias del epítipo HA en la región de la proteína correspondiente al lazo que se encuentra entre las láminas beta IX y X del dominio arrestina N-terminal. El alineamiento de la secuencia aminoacídica de PalF con la de sus homólogos en otros hongos indica que las regiones menos conservadas en los dominios arrestina son las que corresponden a los lazos que unen las láminas beta entre sí. Por lo tanto, estas regiones son buenas candidatas para la introducción de epítipos, ya que no comprometen la estructura ni la función de la proteína.

Nuestros primeros resultados indican que los niveles de expresión de esta proteína son bajos, en comparación con los niveles de expresión de otra proteína de la ruta *pal*, PalB. Una posible explicación para este resultado sería que existiese un mecanismo de retroregulación de la ruta y que PacC reprima la transcripción de *palF*, ya que este mecanismo de regulación ha sido descrito para la ruta *RIM* en *S. cerevisiae*<sup>59</sup>. Experimentos de “Microarrays” y “Northern-blot” han demostrado que la expresión de Rim8, el homólogo de PalF, está bajo el control de la ruta *RIM*. Se ha sugerido que esta regulación podría ser debida a la presencia de sitios de unión de Rim101 en el promotor de *RIM8*, actuando éste como represor<sup>59</sup>. Nuestros resultados indican que los niveles de Rim8 aumentan en un mutante donde la ruta *RIM* está bloqueada, lo que es consistente con que Rim101 pudiera estar reprimiendo la transcripción de Rim8. Sin embargo, en el caso de PalF en *A. nidulans*, no hemos encontrado evidencias para tal mecanismo de autoregulación ya que la cantidad de proteína (PalF) no varía cuando la ruta *pal* está bloqueada ó cuando el factor de transcripción está activo de forma constitutiva (mutante *pacC*<sup>63</sup>).

Una vez conseguidas las condiciones óptimas de extracción, pudimos demostrar mediante “Western-blot” que en el caso de PalF, se detectan dos bandas cuando el cultivo proviene de medio mínimo a pH ácido, mientras que sólo se detecta la banda de menor movilidad electroforética cuando se extrae la proteína de protoplastos. Esta diferencia podría deberse a la degradación de la proteína durante el proceso de extracción ya que en el caso de los protoplastos, la extracción es mucho más rápida y con métodos más suaves.

### 5.4.3. Modificaciones postraduccionales.

Nuestros primeros resultados indicaban que PalF podría sufrir modificaciones postraduccionales ya que la movilidad electroforética de la proteína cambia al cambiar el pH del medio. Este patrón de migración podría ser debido a la fosforilación/defosforilación de la proteína puesto que las  $\beta$ -arrestinas de mamífero están reguladas mediante defosforilación en respuesta a la activación del receptor 7TM correspondiente. Comprobamos que este cambio de movilidad se debe a la fosforilación de PalF mediante un ensayo con fosfatasa  $\lambda$ . A diferencia de las  $\beta$ -arrestinas, que en su conformación basal se encuentran fosforiladas y se defosforilan al interactuar con el receptor 7TM, PalF se encuentra defosforilada en su forma inactiva y se fosforila en respuesta a la señal de pH. La fosforilación de la  $\beta$ -arrestina-1 y  $\beta$ -arrestina-2 en mamíferos está catalizada por las quinasas reguladas por señal extracelular ERK1 y ERK2 y por la caseína quinasa de tipo II, respectivamente<sup>140, 141, 185</sup>. En el caso de PalF, desconocemos la naturaleza de la proteína quinasa que la fosforila y por lo tanto, éste es un tema pendiente de estudio.

Nuestros resultados demuestran que PalF no sólo se fosforila, sino que también se ubiquitina. El patrón de bandas obtenido sugiere que se trata de diubiquitinación ó monoubiquitinación en dos residuos de lisina. El papel de la ubiquitinación en la regulación de las proteínas ha sido ampliamente estudiado por diversos grupos. En rasgos generales, la poliubiquitinación con cadenas conectadas en Lys48 marca la proteína para degradación por el proteasoma. Sin embargo, la monoubiquitinación ó multiubiquitinación de proteínas es una señal de tráfico hacia el endosoma, para su reciclamiento ó degradación vía el lisosoma/vacuola. Existen evidencias de multitud de proteínas reguladas mediante este proceso, como por ejemplo Ste2, el receptor 7TM del factor  $\alpha$  en *S. cerevisiae*. La ubiquitinación de Ste2 parece estar regulada por la fosforilación previa de esta proteína<sup>186</sup>. La cola citoplásmica de Ste2 se fosforila en residuos de Serina y Treonina en respuesta a la unión de la feromona y ambas modificaciones son necesarias para el reciclamiento ó la degradación del receptor. Mutantes que tienen reducida su habilidad para fosforilar Ste2 son incapaces de ubiquitinar e internalizar esta proteína. Estos datos sugieren que la fosforilación de la cola citoplásmica de Ste2 precede y regula de forma positiva la ubiquitinación de éste. Una posible explicación sería que la fosforilación de Ste2 proporcione un sitio reconocido por la maquinaria de ubiquitinación. Otra explicación alternativa sería que la fosforilación induzca cambios conformacionales en el receptor que permitan el acceso de la maquinaria de ubiquitinación a los residuos de lisina. Parece que la molécula de ubiquitina sólo es suficiente para que se produzca la endocitosis de Ste2 ya que su fusión a ubiquitina permite su internalización<sup>187</sup>. Esta información es consistente con que receptores específicos para la ubiquitina están implicados en el proceso de internalización.

En ciertos casos, no es sólo la ubiquitinación del receptor lo que regula su tráfico endocítico, sino también la ubiquitinación de otras proteínas unida al receptor. En mamíferos, una de estas proteínas adaptadoras es la  $\beta$ -arrestina, que se ubiquitina e interactúa con la clatrina para promover la internalización del receptor. Por ejemplo, la activación del receptor de quimioquinas CXCR4 promueve su ubiquitinación mediante la acción de la E3 ubiquitina ligasa AIP4 y su internalización hacia el endosoma temprano. Sin embargo, para que se produzca su tráfico hacia el endosoma tardío y el lisosoma, es necesaria la presencia de la  $\beta$ -arrestina que interactúa con los dominios WW de AIP4<sup>188</sup>. En el caso de PalF, hemos demostrado que esta proteína se ubiquitina en respuesta a la señal de pH ambiental. En concreto, según nuestros resultados, podría tratarse de diubiquitinación ya que observamos una escalera de 8 bandas, que corresponden a las distintas formas de la proteína ubiquitinadas con una o dos moléculas de ubiquitina. La ubiquitinación de PalF podría ser el punto de

conexión con la maquinaria ESCRT implicada en el tráfico de cargos ubiquitinados a nivel del endosoma tardío. Esta hipótesis es consistente con resultados obtenidos posteriormente en *S. cerevisiae* y con un estudio reciente en *A. nidulans*, que demuestran que Rim8 y PalF interactúan con Vps23, un componente de ESCRT-I, y que la ubiquitinación de estas proteínas contribuye a esta interacción<sup>189,190</sup>. En mamíferos, la defosforilación de las  $\beta$ -arrestinas media la internalización del receptor correspondiente ya que controla la unión de las  $\beta$ -arrestinas a Clatrina. La ubiquitinación de las  $\beta$ -arrestinas también regula la internalización del receptor asociado hacia el endosoma. Sin embargo, a diferencia de proteínas de membrana como Ste2 en *S. cerevisiae*, no hay evidencias de que la ubiquitinación y fosforilación de las  $\beta$ -arrestinas sean interdependientes. En el caso de PalF, no sabemos si estas modificaciones se producen de forma independiente, o si dependen una de la otra.

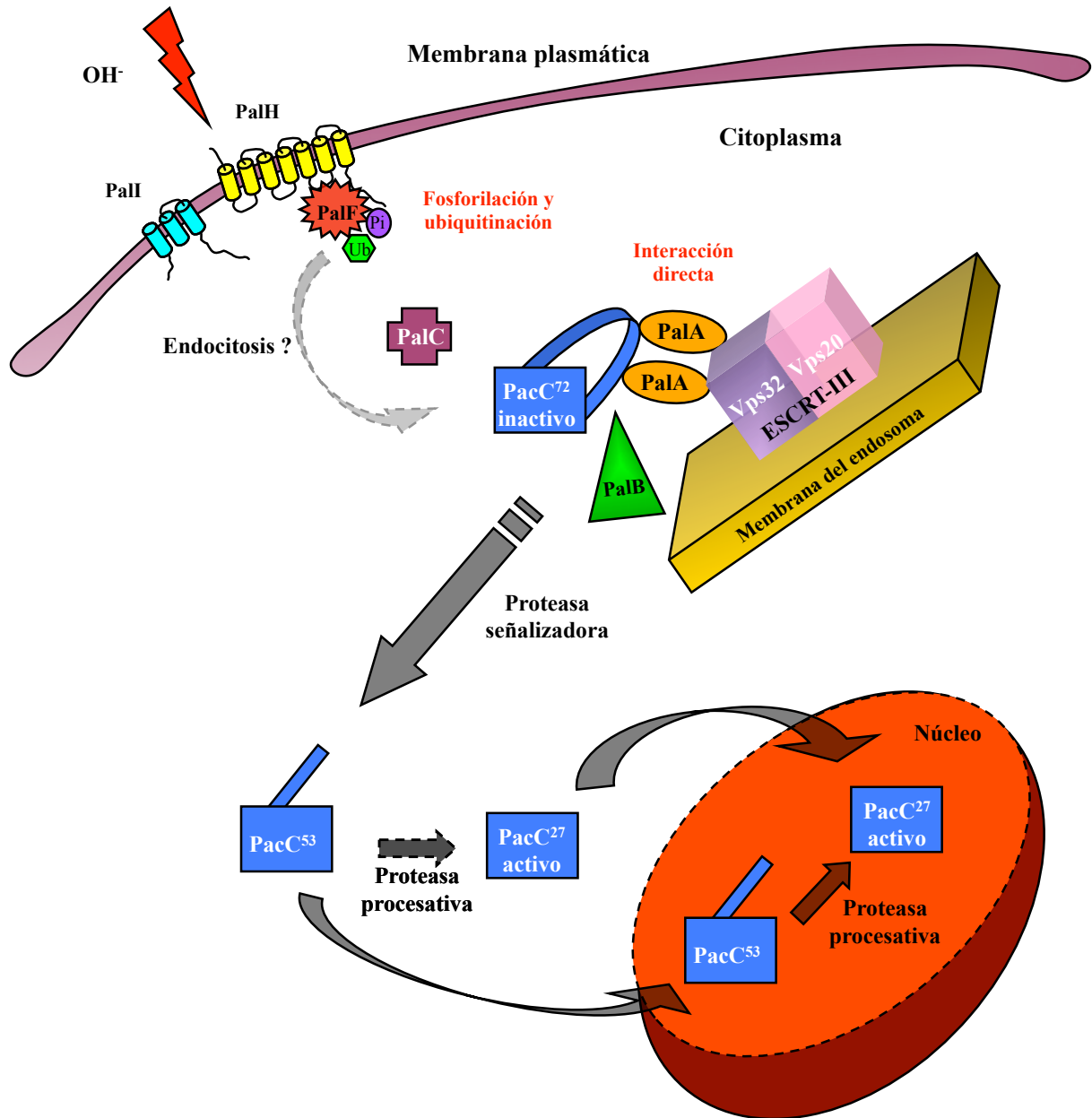
#### 5.4.4. Componentes necesarios de la ruta *pal* para que se produzcan las modificaciones postraduccionales en PalF.

Mediante la utilización de mutantes de la ruta *pal*, comprobamos que las modificaciones postraduccionales en PalF dependen de la funcionalidad de PalH y en parte de la de PalI y de la activación de la ruta por el pH. Utilizamos los distintos fondos mutantes *pal* para comprobar cómo la ausencia de estos genes influye sobre la migración electroforética de PalF. De esta manera pudimos determinar por primera vez el orden de los distintos componentes de esta ruta corriente arriba y abajo de PalF. Para ello, construimos mediante cruce, cepas mutantes (*palH17*, *palA1*, *palB7*, *palC4* y *palI32*) expresando PalF::3HA y analizamos mediante “Western-blot” la movilidad electroforética de PalF. Pudimos comprobar que sólo en el caso de los mutantes *palH17* y *palI32*, la movilidad de PalF se ve afectada. Esto demuestra que estos dos componentes actúan por encima de PalF en la ruta de señalización por pH ambiental y los demás componentes por debajo. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por estudios en *S. cerevisiae* que demostraron que Rim8, Rim21 y Dfg16 actúan corriente arriba de Rim20 y Rim13<sup>182</sup>. Nuestros resultados con respecto a la movilidad electroforética de Rim8 confirman los resultados obtenidos con PalF. Al igual que PalF, Rim8 se fosforila y ubiquitina y nuestros datos, aunque preliminares, sugieren que esta fosforilación es también dependiente de los receptores 7TM y putativos sensores de pH, Rim21 y Dfg16.

#### 5.5. ACTUALIZACIÓN DEL MODELO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN RESPUESTA AL pH AMBIENTAL EN *Aspergillus nidulans*.

El conjunto de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral nos permite modificar el modelo de la ruta de señalización por pH ambiental y ordenar, en parte, los distintos componentes de esta ruta (Figura 38).

Un incremento del pH ambiental origina una señal que es transmitida por las proteínas que integran la ruta *pal* en *A. nidulans*. El sistema sensor PalH-PalI se localizaría en la membrana plasmática y se activaría de forma dependiente de la señal. PalH sería el sensor de la señal de pH mientras que PalI asistiría a PalH para su correcta localización<sup>39</sup>. PalH, al activarse, probablemente cambie su conformación, exponiendo la cola citoplásmica C-terminal, lo que permitiría el reclutamiento de PalF que a su vez sería fosforilada y ubiquitinada de forma dependiente de PalH y PalI, e independiente de PalA, PalB y PalC (esta tesis). No conocemos el orden de los eventos de fosforilación y ubiquitinación y no sabemos si estos dos eventos son secuenciales. PalF podría fosforilarse en primer lugar, lo que podría ocasionar un cambio conformacional en la estructura tridimensional de la proteína, haciendo que los sitios de ubiquitinación queden expuestos.



**Figura 38. Modelo molecular actual de regulación de la expresión génica en respuesta al pH ambiental en el hongo *A. nidulans*. Ver descripción en el texto.**

Otra posibilidad sería que PalF primero se ubiquitinara y luego se fosforilara. También es posible que ambas modificaciones ocurran de manera independiente una de la otra. En cualquier caso, los cambios que sufre PalF son probablemente los que permiten la transmisión de la señal de pH corriente abajo en la ruta.

Un estudio posterior en *S. cerevisiae* y un trabajo recientemente publicado en *A. nidulans* apoyan esta hipótesis<sup>189,190</sup>. Los resultados obtenidos demuestran que la ubiquitinación de Rim8 y PalF contribuye a la interacción con Vps23, un componente de ESCRT-I. Dada esta conexión directa entre PalF/Rim8 y la maquinaria ESCRT, 2 modelos alternativos pueden ser considerados para explicar de que forma la señal se transmite una vez detectada por los sensores de pH ambiental en la membrana plasmática.

En un modelo más “clásico” (Figura 38), la internalización de PalH por endocitosis permitiría el reclutamiento mediado por PalF de la maquinaria ESCRT a la superficie de la membrana del endosoma.

Hemos demostrado que el dominio Bro1 de PalA interacciona directamente con la proteína del complejo ESCRT-III, Vps32, lo que permitiría reclutar la maquinaria de procesamiento de PacC a este complejo. Por otra parte, otro componente de ESCRT-III, Vps24, recluta a la calpaína atípica PalB a través de su dominio MIT<sup>183</sup>. Los dos motivos YPXL/I de PacC<sup>72</sup> interaccionan con PalA<sup>40</sup>. La formación de un complejo proteico formado por componentes de ESCRT-III, PalA, PalB y PacC, permitiría la acción de la proteasa señalizadora, posiblemente PalB, que cortaría PacC a la altura de los aminoácidos 493-500. Este modelo estaría basado en la existencia de 2 complejos implicados en la señalización por pH ambiental, uno localizado en la membrana plasmática y el otro asociado a la membrana del endosoma. Los dos complejos estarían conectados mediante la endocitosis del complejo formado por PalH y PalF puesto que las arrestinas actúan como adaptadores endocíticos en mamíferos. Un candidato adicional en la comunicación entre ambos complejos es PalC, cuya función está aún sin determinar. Finalmente, el procesamiento proteolítico de PacC por PalB permitiría la eliminación del extremo C-terminal del factor de transcripción, dando lugar a la forma PacC<sup>53</sup> y a la anulación de las interacciones intramoleculares entre las regiones A, B y C que mantienen la proteína en su conformación cerrada y inactiva. La pérdida de las interacciones dejaría accesible y activa a la NLS2 bipartita situada entre los aminoácidos 252 y 269, desactivando simultáneamente el mecanismo que retenía a PacC<sup>72</sup> en el citoplasma. La proteasa procesativa truncaría a PacC<sup>53</sup> en el aminoácido 252 aproximadamente dando lugar a la aparición de la forma PacC<sup>27</sup> que ejerce su actividad en el núcleo.

Dos estudios publicados recientemente<sup>189,190</sup> sugieren un modelo alternativo que no implica la internalización por endocitosis del complejo sensor de pH ambiental. Los resultados obtenidos sugieren que el reclutamiento de la maquinaria ESCRT tiene lugar en la membrana plasmática. Una vez ensamblados, los complejos ESCRT permitirían el procesamiento del factor de transcripción a la superficie de la membrana plasmática. Este segundo modelo sería consistente con el hecho de que proteínas implicadas en las etapas tempranas de la vía endocítica, Sla1 y End3, no son necesarias para la transducción de la señal de pH en *S. cerevisiae*<sup>166</sup>. Por otra parte, este mecanismo tendría similitudes con el proceso mediante el cual proteínas retrovirales reclutan la maquinaria ESCRT a la superficie de la membrana plasmática para generar vesículas víricas en células animales.





## **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES.

1. La expresión condicional de un mutante dominante negativo de Vps4 (Vps4<sup>E232Q</sup>), que impide la disociación de la maquinaria endocítica ESCRT en otros organismos, inhibe el crecimiento de *Aspergillus nidulans* pero no bloquea el procesamiento del factor de transcripción PacC en respuesta a la señal de pH.
2. PalA interacciona de forma directa con el componente de ESCRT-III, Vps32.
3. La región N-terminal de PalA, que contiene el dominio Bro1, es responsable de la interacción con Vps32.
4. Las proteínas con dominio Bro1, Rim20 y Bro1 en *Saccharomyces cerevisiae*, y EhADH112 en *Entamoeba histolytica*, también interaccionan de forma directa con el homólogo de Vps32 en estos organismos. Esto indica que una de las características de las proteínas con dominio Bro1 es interaccionar con el componente Vps32 (Snf7) del complejo ESCRT-III.
5. PalA, PalB y PacC no se encuentran asociados en la fracción soluble de extractos celulares, lo que podría ser debido a la insolubilidad del complejo correspondiente que interacciona con una maquinaria (ESCRT) asociada a la membrana endosomal.
6. Los niveles de expresión de PalF son aproximadamente diez veces menores que los de PalB.
7. PalF, al igual que las  $\beta$ -arrestinas de mamíferos, sufre modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la ubiquitinación.
8. PalF se fosforila y ubiquitina en respuesta a la señal de pH.
9. Tanto la fosforilación como la ubiquitinación de PalF son dependientes de PalH, parcialmente dependientes de PalI, e independientes de PalA, PalB y PacC. Esto demuestra que PalH y PalI actúan corriente arriba de PalF en la ruta *pal* y los demás componentes lo hacen corriente abajo.
10. La expresión de una forma constitutivamente activa de PacC (*pacC<sup>c63</sup>*), no afecta a los niveles de expresión y a las modificaciones postraduccionales de PalF. Esto indica que, a diferencia de lo que ocurre en la ruta *RIM* en *S. cerevisiae*, no existe un bucle de retroregulación de PalF por PacC.
11. Una reducción drástica de los niveles de calcio en la célula no afecta a la fosforilación dependiente de pH de PalF.
12. El procesamiento proteolítico de Rim101 en *S. cerevisiae*, al igual que el de PacC en *A. nidulans*, se produce de forma muy rápida en respuesta a un incremento del pH ambiental y requiere la integridad de la ruta *RIM*.
13. Rim8 se fosforila y ubiquitina en *S. cerevisiae*, al igual que su homólogo PalF en *A. nidulans*.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Pontecorvo,G., Roper,J.A., Hemmons,L.M., Macdonald,K.D. & Bufton,A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet* **5**, 141-238 (1953).
2. Timberlake,W.E. Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Ann. Rev. Genet.* **24**, 5-36 (1990).
3. Adams,T.H., Wieser,J.K. & Yu,J.H. Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 35-54 (1998).
4. Dyer,P.S., Paoletti,M. & Archer,D.B. Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149**, 2301-2303 (2003).
5. Axelrod,D.E., Gealt,M. & Pastushok,M. *Gene control of developmental competence in Aspergillus nidulans*. *Dev. Biol.* **34**, 9-15 (1973).
6. Peñalva,M.A. A fungal perspective on human inborn errors of metabolism: alkaptonuria and beyond. *Fungal. Genet. Biol.* **34**, 1-10 (2001).
7. Galagan,J.E. *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115 (2005).
8. Souza,C.A., Silva,C.C. & Ferreira,A.V. Sex in fungi: lessons of gene regulation. *Genet. Mol. Res.* **2**, 136-147 (2003).
9. Rossi,A. & Arst,H.N., Jr. Mutants of *Aspergillus nidulans* able to grow at extremely acidic pH acidify the medium less than the wild type when grown at more moderate pH. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**, 51-54 (1990).
10. Caddick,M.X., Brownlee,A.G. & Arst,H.N., Jr. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **203**, 346-353 (1986).
11. Caddick,M.X. & Arst,H.N., Jr. Structural genes for phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. Cam.* **47**, 83-91 (1986).
12. Espeso,E.A., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr. & Peñalva,M.A. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.* **12**, 3947-3956 (1993).
13. Espeso,E.A. & Peñalva,M.A. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc- finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *J Biol. Chem.* **271**, 28825-28830 (1996).
14. Dorn,G. Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Genet. Res. Cam.* **6**, 13-26 (1965).
15. Dorn,G. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. *Science* **150**, 1183-1184 (1965).
16. Espeso,E.A. *et al.* Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J. Mol. Biol.* **274**, 466-480 (1997).
17. Orejas,M. *et al.* Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622-1632 (1995).
18. Tilburn,J. *et al.* The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779-790 (1995).
19. Arst,H.N., Jr., Bignell,E. & Tilburn,J. Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 787-790 (1994).

## BIBLIOGRAFÍA

20. Negrete-Urtasun,S. *et al.* Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* **33**, 994-1003 (1999).
21. Denison,S.H. *et al.* Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol. Microbiol.* **30**, 259-264 (1998).
22. Denison,S.H., Orejas,M. & Arst,H.N., Jr. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J. Biol. Chem.* **270**, 28519-28522 (1995).
23. Maccheroni,W., May,G.S., Martinez-Rossi,N.M. & Rossi,A. The sequence of *palF*, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **194**, 163-167 (1997).
24. Negrete-Urtasun,S., Denison,S.H. & Arst,H.N., Jr. Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* **179**, 1832-1835 (1997).
25. Peñalva,M.A. & Arst,H.N., Jr. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 425-451 (2004).
26. Blanchin-Roland,S., Cordero-Otero,R. & Gaillardin,C. Two upstream activation sequences control the expression of the *XPR2* gene in the yeast *Yarrowia lypolytica*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 327-338 (1994).
27. Suárez,T. & Peñalva,M.A. Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol. Microbiol.* **20**, 529-540 (1996).
28. Díez,E. *et al.* Activation of the *Aspergillus* PacC zinc-finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* **21**, 1350-1359 (2002).
29. Espeso,E.A. *et al.* On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* **19**, 719-728 (2000).
30. Peñas MM *et al.* Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryot. Cell* **6**, 960-970 (2007).
31. Mingot,J.M., Espeso,E.A., Díez,E. & Peñalva,M.A. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1688-1699 (2001).
32. Mingot,J.M. *et al.* Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1390-1400 (1999).
33. Arst,H.N., Jr. & Peñalva,M.A. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends in Genetics* **19**, 224-231 (2003).
34. Hervas-Aguilar,A., Rodriguez,J.M., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr. & Penalva,M.A. Evidence for the Direct Involvement of the Proteasome in the Proteolytic Processing of the *Aspergillus nidulans* Zinc Finger Transcription Factor PacC. *J. Biol. Chem.* **282**, 34735-34747 (2007).
35. Fernández-Martínez,J. *et al.* Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* **334**, 667-684 (2003).
36. Espeso,E.A. & Arst,H.N., Jr. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3355-3363 (2000).
37. Fernández-Martínez,J. Mecanismos y señales que regulan el transporte nuclear del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid (2006).



38. Galindo,A. *et al.* PalC, One of Two Bro1 Domain Proteins in the Fungal pH Signalling Pathway, Localizes to Cortical Structures and Binds Vps32. *Traffic* **8**, 1346-1364 (2007).
39. Calcagno-Pizarelli,A.M. *et al.* Establishment of the Ambient pH Signaling Complex in *Aspergillus nidulans*: PalI Assists Plasma Membrane Localization of PalH. *Eukaryot. Cell* **6**, 2365-2375 (2007).
40. Vincent,O., Rainbow,L., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr. & Peñalva,M.A. YPXL/I Is a Protein Interaction Motif Recognized by *Aspergillus* PalA and Its Human Homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1647-1655 (2003).
41. Futai,E. *et al.* The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **260**, 559-568 (1999).
42. Sorimachi,H., Ishiura,S. & Suzuki,K. Structure and physiological functions of calpains. *Biochem. J.* **328**, 721-732 (1997).
43. Futai,E., Kubo,T., Sorimachi,H., Suzuki,K. & Maeda,T. Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim. Biophys. Acta* **1517**, 316-319 (2001).
44. Sorimachi,H. & Suzuki,K. The structure of calpain. *J. Biochem.* **129**, 653-664 (2001).
45. Peñalva,M.A. & Arst,H.N., Jr. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 426-446 (2002).
46. MacCabe,A.P., van den Hombergh,J.P.T.W., Tilburn,J., Arst,H.N., Jr. & Visser,J. Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol. Gen. Genet.* **250**, 367-374 (1996).
47. Schmitt,E.K., Kempken,R. & Kuck,U. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genom.* **265**, 508-518 (2001).
48. Rollins,J.A. & Dickman,M.B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 75-81 (2001).
49. Machida M & Kikuchi H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**, 1157-1161 (2005).
50. Lamb,T.M., Xu,W., Diamond,A. & Mitchell,A.P. Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 1850-1856 (2001).
51. Causton,H.C. *et al.* Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**, 323-337 (2001).
52. Serrano,R., Bernal,D., Chambers,JR. & Ariño,J. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol.* **46**, 1319-1333 (2002).
53. Li,W.S. & Mitchell,A.P. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**, 63-73 (1997).
54. Su,S.S. & Mitchell,A.P. Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene *RIM1*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3789-3797 (1993).
55. Xu,W. & Mitchell,A.P. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* **183**, 6917-6923 (2001).

## BIBLIOGRAFÍA

56. Treton,B., Blanchin-Roland,S., Lambert,M., Lepingle,A. & Gaillardin,C. Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes *palF* and *palH*. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 505-513 (2000).
57. Barwell,K.J., Boysen,J.H., Xu,W. & Mitchell,A.P. Relationship of *DFG16* to the Rim101p pH Response Pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **4**, 890-899 (2005).
58. Su,S.S. & Mitchell,A.P. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**, 67-77 (1993).
59. Lamb,T.M. & Mitchell,A.P. The Transcription Factor Rim101p Governs Ion Tolerance and Cell Differentiation by Direct Repression of the Regulatory Genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 677-686 (2003).
60. Calderone,R.A. & Fonzi,W.A. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends. Microbiol.* **9**, 327-335 (2001).
61. Ramón,A.M., Porta,A. & Fonzi,W.A. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J. Bacteriol.* **181**, 7524-7530 (1999).
62. Porta,A., Ramón,A.M. & Fonzi,W.A. *PRR1*, a homolog of *Aspergillus nidulans palF*, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**, 7516-7523 (1999).
63. Davis,D., Wilson,R.B. & Mitchell,A.P. *RIM101*-dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 971-978 (2000).
64. Berman,D.M. *et al.* Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* **425**, 780-782 (2003).
65. Lai,K., Kaspar,B., Gage,F.H. & Schaffer,D.V. Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nature Neuroscience* **6**, 21-27 (2003).
66. Taipale,J. & Beachy,PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* **411**, 349-354 (2001).
67. Pavletich,N.P. & Pabo,C.O. Crystal structure of a five-finger GLI-DNA complex: new perspectives on zinc fingers. *Science* **261**, 1701-1707 (1993).
68. Wang,Q.T. & Holmgren,R.A. The subcellular localization and activity of *Drosophila* Cubitus interruptus are regulated at multiple levels. *Development* **126**, 5097-5106 (1999).
69. Aza-Blanc,P., Ramirez-Weber,F.A., Laget,M.P., Schwartz,C. & Kornberg,T.B. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**, 1043-1053 (1997).
70. Incardona,J.P., Gruenberg,J. & Roelink,H. Sonic Hedgehog Induces the Segregation of Patched and Smoothed in Endosomes. *Current Biology* **12**, 983-995 (2002).
71. Ohlmeyer,J.T. & Kalderon,D. Hedgehog stimulates maturation of Cubitus interruptus into a labile transcriptional activator. *Nature* **396**, 749-753 (1998).
72. Wilbanks,A.M. *et al.* beta-Arrestin 2 Regulates Zebrafish Development Through the Hedgehog Signaling Pathway. *Science* **306**, 2264-2267 (2004).
73. Chen,W. *et al.* Activity-Dependent Internalization of Smoothed Mediated by beta-Arrestin 2 and GRK2. *Science* **306**, 2257-2260 (2004).

74. Tian,L., Holmgren,R.A. & Matouschek,A. A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-kappaB. *Nature Struct. Mol. Biol.* **12**, 1045-1053 (2005).
75. Katzmann,D.J., Odorizzi,G. & Emr,S.D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905 (2002).
76. Gruenberg,J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 721-730 (2001).
77. Mellman,I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 575-625 (1996).
78. Babst,M. A Protein's Final ESCRT. *Traffic* **6**, 2-9 (2005).
79. Garrus,J.E. *et al.* Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**, 55-65 (2001).
80. Kostelansky,M.S. *et al.* Structural and Functional Organization of the ESCRT-I Trafficking Complex. *Cell* **125**, 113-126 (2006).
81. Bryant,N.J. & Stevens,T.H. Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 230-247 (1998).
82. Hurley,J.H. & Emr,S.D. The ESCRT complexes: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 277-298 (2006).
83. Katzmann,D.J., Babst,M. & Emr,S.D. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-155 (2001).
84. Raiborg,C., Rusten,T.E. & Stenmark,H. Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 446-455 (2003).
85. Lauwers,E., Jacob,C. & Andre,B. K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway. *J. Cell Biol.* **185**, 493-502 (2009).
86. Saksena,S., Sun,J., Chu,T. & Emr,S.D. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 561-573 (2007).
87. Katzmann,D.J., Stefan,C.J., Babst,M. & Emr,S.D. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* **162**, 413-423 (2003).
88. Ren,X. & Hurley,J.H. Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast. *EMBO J* **30**, 2130-2139 (2011).
89. Ren,J., Kee,Y., Huijbregtse,J.M. & Piper,R.C. Hse1, a component of the yeast Hrs-STAM ubiquitin-sorting complex, associates with ubiquitin peptidases and a ligase to control sorting efficiency into multivesicular bodies. *Mol. Biol. Cell* **18**, 324-335 (2007).
90. Kostelansky,M.S. *et al.* Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* **129**, 485-498 (2007).
91. Alam,S.L. *et al.* Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J.* **23**, 1411-1421 (2004).
92. Gill,D.J. *et al.* Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* **26**, 600-612 (2007).
93. Pineda-Molina,E. *et al.* The Crystal Structure of the C-Terminal Domain of Vps28 Reveals a Conserved Surface Required for Vps20 Recruitment. *Traffic* **7**, 1007-1016 (2006).

## BIBLIOGRAFÍA

94. Chu,T., Sun,J., Saksena,S. & Emr,S.D. New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J. Cell Biol.* **175**, 815-823 (2006).
95. Curtiss,M., Jones,C. & Babst,M. Efficient Cargo Sorting by ESCRT-I and the Subsequent Release of ESCRT-I from Multivesicular Bodies Requires the Subunit Mvb12. *Mol. Biol. Cell* **18**, 636-645 (2007).
96. Teo,H. *et al.* ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes. *Cell* **125**, 99-111 (2006).
97. Slagsvold,T. *et al.* Eap45 in Mammalian ESCRT-II Binds Ubiquitin via a Phosphoinositide-interacting GLUE Domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 19600-19606 (2005).
98. Teo,H., Perisic,O., González,B. & Williams,R.L. ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev. Cell* **7**, 559-569 (2004).
99. Babst,M., Katzmann,D., Estepa-Sabal,E., Meerloo,T. & Emr,S. Escrt-III. An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev. Cell* **3**, 271-282 (2002).
100. Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE & Emr SD. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *J Biol Chem* **136**, 97-109 (2009).
101. Wollert T & Hurley JH. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864-869 (2010).
102. Odorizzi,G., Katzmann,D.J., Babst,M., Audhya,A. & Emr,S.D. Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **116**, 1893-1903 (2003).
103. Luhtala,N. & Odorizzi,G. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.* **166**, 717-729 (2004).
104. Bowers,K. *et al.* Protein-protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic.* **5**, 194-210 (2004).
105. Strack,B., Calistri,A., Craig,S., Popova,E. & Gottlinger,H.G. AIP1/ALIX Is a Binding Partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 Functioning in Virus Budding. *Cell* **114**, 689-699 (2003).
106. Von Schwedler,U.K. *et al.* The Protein Network of HIV Budding. *Cell* **114**, 701-713 (2003).
107. Garcia-Rivera,G. *et al.* *Entamoeba histolytica* : a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Mol. Microbiol.* **33**, 556-568 (1999).
108. Bañuelos,C., Garcia-Rivera,G., Lopez-Reyes,I. & Orozco,E. Functional characterization of EhADH112: An *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein. *Exp. Parasitol.* **110**, 292-297 (2005).
109. Babst,M., Sato,T.K., Banta,L.M. & Emr,S.D. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J.* **16**, 1820-1831 (1997).
110. Babst,M., Wendland,B., Estepa,E.J. & Emr,S.D. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.* **17**, 2982-2993 (1998).
111. Azmi,I. *et al.* Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1. *J. Cell Biol.* **172**, 705-717 (2006).
112. Stuchell-Brereton,M.D. *et al.* ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* **449**, 740-744 (2007).
113. Scott,A. *et al.* Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J.* **24**, 3658-3669 (2005).

114. Hartmann,C. *et al.* Vacuolar Protein Sorting: Two Different Functional States of the AAA-ATPase Vps4p. *J. Mol. Biol.* **377**, 352-363 (2008).
115. Gurevich,V.V. *et al.* The functional cycle of visual arrestins in photoreceptor cells. *Prog. Retin. Eye Res.* **30**, 405-430 (2011).
116. Gurevich,E. & Gurevich,V. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol.* **7**, 236 (2006).
117. Hirsch,J.A., Schubert,C., Gurevich,V.V. & Sigler,P.B. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **97**, 257-269 (1999).
118. Han,M., Gurevich,V.V., Vishnivetskiy,S.A., Sigler,P.B. & Schubert,C. Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure* **9**, 869-880 (2001).
119. Sutton,R.B. *et al.* Crystal Structure of Cone Arrestin at 2.3 Å: Evolution of Receptor Specificity. *J. Mol. Biol.* **354**, 1069-1080 (2005).
120. Luttrell,L.M. & Lefkowitz,R.J. The role of {beta}-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci.* **115**, 455-465 (2002).
121. Gurevich,V.V. & Gurevich,E.V. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol. Sci.* **25**, 105-111 (2004).
122. Gurevich,V.V. *et al.* Arrestin Interactions with G Protein-coupled Receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 720-731 (1995).
123. Gurevich,V.V. & Benovic,J.L. Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J. Biol. Chem.* **268**, 11628-11638 (1993).
124. Hanson,S.M., Francis,D.J., Vishnivetskiy,S.A., Klug,C.S. & Gurevich,V.V. Visual Arrestin Binding to Microtubules Involves a Distinct Conformational Change. *J. Biol. Chem.* **281**, 9765-9772 (2006).
125. Palczewski,K., Pulvermuller,A., Buczylo,J. & Hofmann,K.P. Phosphorylated rhodopsin and heparin induce similar conformational changes in arrestin. *J. Biol. Chem.* **266**, 18649-18654 (1991).
126. Hanson,S.M. *et al.* Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4900-4905 (2006).
127. Vishnivetskiy,S.A., Hirsch,J.A., Velez,M.G., Gurevich,Y.V. & Gurevich,V.V. Transition of Arrestin into the Active Receptor-binding State Requires an Extended Interdomain Hinge. *J. Biol. Chem.* **277**, 43961-43967 (2002).
128. Vishnivetskiy,S.A., Hosey,M.M., Benovic,J.L. & Gurevich,V.V. Mapping the Arrestin-Receptor Interface: Structural Elements Responsible for Receptor Specificity of Arrestin Proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 1262-1268 (2004).
129. Gurevich,V.V. & Gurevich,E.V. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **110**, 465-502 (2006).
130. Gurevich,V.V. & Gurevich,E.V. The New Face of Active Receptor Bound Arrestin Attracts New Partners. *Structure* **11**, 1037-1042 (2003).
131. Song,X., Raman,D., Gurevich,E.V., Vishnivetskiy,S.A. & Gurevich,V.V. Visual and Both Non-visual Arrestins in Their "Inactive" Conformation Bind JNK3 and Mdm2 and Relocalize Them from the Nucleus to the Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **281**, 21491-21499 (2006).

## BIBLIOGRAFÍA

132. Gurevich,E.V., Benovic,J.L. & Gurevich,V.V. Arrestin2 expression selectively increases during neural differentiation. *J. Neurochem.* **91**, 1404-1416 (2004).
133. Barak,L.S., Warabi,K., Feng,X., Caron,M.G. & Kwatra,M.M. Real-time Visualization of the Cellular Redistribution of G Protein-coupled Receptor Kinase 2 and beta-Arrestin 2 during Homologous Desensitization of the Substance P Receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 7565-7569 (1999).
134. Lefkowitz,R.J. & Shenoy,S.K. Transduction of Receptor Signals by {beta}-Arrestins. *Science* **308**, 512-517 (2005).
135. Lefkowitz,R.J., Pitcher,J.A., Daaka,Y. & Krueger,K.M. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv. Pharmacol.* **42**, 416-420 (1998).
136. Krupnick,J.G., Santini,F., Gagnon,A.W., Keen,J.H. & Benovic,J.L. Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J. Biol. Chem.* **272**, 32507-32512 (1997).
137. Goodman,O.B.J. *et al.* Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450 (1996).
138. Laporte,S.A. *et al.* The beta 2-adrenergic receptor/beta arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3712-3717 (1999).
139. Laporte,S.A., Oakley,R.H., Holt,J.A., Barak,L.S. & Caron,M.G. The interaction of beta-Arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **275**, 23120-23126 (2000).
140. Kim,Y.M., Barak,L.S., Caron,M.G. & Benovic,J.L. Regulation of Arrestin-3 Phosphorylation by Casein Kinase II. *J. Biol. Chem.* **277**, 16837-16846 (2002).
141. Lin,F.T., *et al.* Phosphorylation of beta-arrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry.* **41**, 10692-10699 (2002).
142. Hochstrasser,M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-439. (1996).
143. Hershko,A. & Ciechanover,A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479 (1998).
144. Shenoy,S.K., McDonald,P.H., Kohout,T.A. & Lefkowitz,R.J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* **294**, 1307-1313 (2001).
145. Mukherjee,A. *et al.* Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat Cell Biol.* **7**, 1191-1201 (2005).
146. Rubin,D.M. & Finley,D. Proteolysis: The proteasome: a protein-degrading organelle? *Current Biology* **5**, 854-858 (1995).
147. Hartmann-Petersen,R., Seeger,M. & Gordon,C. Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 26-31 (2003).
148. Claing,A. *et al.* Beta-arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 42509-42513 (2001).
149. Shenoy,S.K. & Lefkowitz,R.J. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J* **375**, 503-515 (2003).
150. Luttrell,L.M. *et al.* Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661 (1999).

151. Sun,Y., Cheng,Z., Ma,L. & Pei,G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* **277**, 49212-49219 (2002).
152. McDonald,P.H. *et al.* Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* **290**, 1574-1577 (2000).
153. Thomas,W.G. & Qian,H. Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**, 130-136 (2003).
154. Buchanan,FG. & DuBois,RN. Emerging roles of beta-arrestins. *Cell Cycle* **5**, 2060-2063 (2006).
155. Fuchs,S. *et al.* A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat. Genet.* **10**, 360-362 (1995).
156. Ito,T. *et al.* A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4569-4574 (2001).
157. Cove,D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 51-56 (1966).
158. Sambrook,J., Fritsch,EF. & Maniatis,T. Molecular cloning: A laboratory manual. *Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York* (1989).
159. Mooney,J.L. & Yager,L.N. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4**, 1473-1482. (1990).
160. Clutterbuck,A.J. The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 1731-1738 (1990).
161. Bachmann,B.J. Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 7. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **47**, 180-230 (1983).
162. Fernández-Cañón,J.M. & Peñalva,M.A. Overexpression of two penicillin structural genes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 110-118 (1995).
163. Tyers,M., Tokiwa,G., Nash,R. & Futcher,B. The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* **11**, 1773-1784 (1992).
164. Schneider,BL., Seufert,W., Steiner,B., Yang,QH. & Futcher,B. Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* **11**, 1265-1274 (1995).
165. Ruden,D.M., Ma,J., Li,Y., Wood,K. & Ptashne,M. Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**, 250-252 (1991).
166. Rothfels,K. *et al.* Components of the ESCRT Pathway, *DFG16*, and *YGR122w* Are Required for Rim101 To Act as a Corepressor with Nrg1 at the Negative Regulatory Element of the *DIT1* Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6772-6788 (2005).
167. Sikorski,R.S. & Hieter,P. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27 (1989).
168. Ellison,M.J. & Hochstrasser,M. Epitope-tagged ubiquitin. A new probe for analyzing ubiquitin function. *J. Biol. Chem.* **266**, 21150-21157 (1991).
169. Tilburn,J. *et al.* Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-211 (1983).
170. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).

## BIBLIOGRAFÍA

171. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685 (1970).
172. Scheuring,S. *et al.* Cloning, characterisation, and functional expression of the *Mus musculus* SKD1 gene in yeast demonstrates that the mouse SKD1 and the yeast VPS4 genes are orthologues and involved in intracellular protein trafficking. *Gene* **234**, 149-159 (1995).
173. Lefkowitz,R.J., Rajagopal,K. & Whalen,E.J. New Roles for [beta]-Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors. *Mol. Cell* **24**, 643-652 (2006).
174. Lefkowitz,R.J. & Whalen,E.J. [beta]-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.***16**, 162-168 (2004).
175. Findon,H. *et al.* Analysis of a novel calcium auxotrophy in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **47**, 647-655 (2010).
176. López-Reyes,I. *et al.* Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. *J Biomed. Bioechnol.* **2010**, 890674 (2010).
177. Bañuelos,C. *et al.* EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. *J Biomed. Bioechnol.* **2012**, 657942 (2012).
178. Tilburn,J., Sanchez-Ferrero,J.C., Reoyo,E., Arst,H.N., Jr. & Penalva,M.A. Mutational Analysis of the pH Signal Transduction Component PalC of *Aspergillus nidulans* Supports Distant Similarity to BRO1 Domain Family Members. *Genetics* **171**, 393-401 (2005).
179. Kim,J. *et al.* Structural Basis for Endosomal Targeting by the Bro1 Domain. *Dev. Cell* **8**, 937-947 (2005).
180. Blanchin-Roland,S., Costa,G.D. & Gaillardin,C. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **151**, 3627-3637 (2005).
181. Calcagno-Pizarelli,A.M. *et al.* Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. *J. Cell Sci.* **124**, 4064-4076 (2011).
182. Hayashi,M., Fukuzawa,T., Sorimachi,H. & Maeda,T. Constitutive Activation of the pH-Responsive Rim101 Pathway in Yeast Mutants Defective in Late Steps of the MVB/ESCRT Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9478-9490 (2005).
183. Galan rodriguez,O., Galindo,A., Hervas-Aguilar,A., Arst Jr,H.N. & Peñalva,M.A. Physiological Involvement in pH Signaling of Vps24-mediated Recruitment of *Aspergillus* PalB Cysteine Protease to ESCRT-III. *J. Biol. Chem.* **284**, 4404-4412 (2009).
184. Xu,W., Smith,F.J., Jr., Subaran,R. & Mitchell,A.P. Multivesicular Body-ESCRT Components Function in pH Response Regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5528-5537 (2004).
185. Lin,F.T., Miller,W.E., Luttrell,L.M. & Lefkowitz,R.J. Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 15971-15974 (1999).
186. Hicke,L., Zanolari,B. & Riezman,H. Cytoplasmic Tail Phosphorylation of the alpha Factor Receptor Is Required for Its Ubiquitination and Internalization. *J. Cell Biol.* **141**, 349-358 (1998).
187. Terrell,J., Shih,S., Dunn,R. & Hicke,L. A Function for Monoubiquitination in the Internalization of a G Protein-Coupled Receptor. *Molecular Cell* **1**, 193-202 (1998).



188. Bhandari,D., Trejo,J., Benovic,J.L. & Marchese,A. Arrestin-2 Interacts with the Ubiquitin-Protein Isopeptide Ligase Atrophin-interacting Protein 4 and Mediates Endosomal Sorting of the Chemokine Receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* **282**, 36971-36979 (2007).
189. Herrador,A., Herranz,S., Lara,D. & Vincent,O. Recruitment of the ESCRT Machinery to a Putative Seven-Transmembrane-Domain Receptor Is Mediated by an Arrestin-Related Protein. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 897-907 (2010).
190. Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HN Jr & Peñalva MÁ. An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *Adv. Enzymol.* **125**, 1784-1795 (2012).



## 8. ANEXO

Los siguientes artículos se han derivado del trabajo experimental realizado en esta tesis:

**Herranz S.**, Rodríguez J.M., Bussink H.J., Sánchez-Ferrero J.C., Arst H.N., Peñalva M.A. and Vincent O. (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 112, 12141-12146.

Herrador A., **Herranz S.**, Lara D. and Vincent O. (2010) Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. ***Molecular and Cellular Biology*** 30:897-907.

Bañuelos C., García-Rivera G., López-Reyes I., Mendoza L., González-Robles A., **Herranz S.**, Vincent O. and Orozco E. (2012) EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. ***Journal of Biomedicine and Biotechnology***, 2012, 657942.

Otros artículos publicados:

López-Reyes I., García-Rivera G., Bañuelos C., **Herranz S.**, Vincent O., López-Camarillo C., Marchat L.A. and Orozco E. (2010) Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein. ***Journal of Biomedicine and Biotechnology***, 2010, 890674.



# Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi

Silvia Herranz\*, José M. Rodríguez\*<sup>†</sup>, Henk-Jan Bussink<sup>‡</sup>, Juan C. Sánchez-Ferrero\*, Herbert N. Arst, Jr.<sup>‡</sup>, Miguel A. Peñalva\*, and Olivier Vincent\*<sup>§</sup>

\*Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28040, Spain; and <sup>‡</sup>Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Imperial College London, Du Cane Road, London W12 0NN, United Kingdom

Edited by Robert J. Lefkowitz, Duke University Medical Center, Durham, NC, and approved July 10, 2005 (received for review June 8, 2005)

**Metazoan arrestins bind to seven-transmembrane (7TM) receptors to regulate function. *Aspergillus nidulans* PalF, a protein involved in the fungal ambient pH signaling pathway, contains arrestin N-terminal and C-terminal domains and binds strongly to two different regions within the C-terminal cytoplasmic tail of the 7TM, putative pH sensor PalH. Upon exposure to alkaline ambient pH, PalF is phosphorylated and, like mammalian  $\beta$ -arrestins, ubiquitinated in a signal-dependent and 7TM protein-dependent manner. Substitution in PalF of a highly conserved arrestin N-terminal domain Ser residue prevents PalF–PalH interaction and pH signaling *in vivo*. Thus, PalF is the first experimentally documented fungal arrestin-related protein, dispelling the notion that arrestins are restricted to animal proteomes. Epistasis analyses demonstrate that PalF posttranslational modification is partially dependent on the 4TM protein PalI but independent of the remaining pH signal transduction pathway proteins PalA, PalB, and PalC, yielding experimental evidence bearing on the order of participation of the six components of the pH signal transduction pathway. Our data strongly implicate PalH as an ambient pH sensor, possibly with the cooperation of PalI.**

seven-transmembrane receptor | signal transduction | ubiquitination | *Aspergillus* | endocytosis

Arrestins play key roles in signal transduction through interaction with cytoplasmic domains of seven-transmembrane (7TM) receptors, regulating activity after receptor activation and phosphorylation by specific kinases (1, 2). Of the four known mammalian arrestins, visual and cone arrestins are expressed in photoreceptors, regulating rhodopsin and cone opsins, respectively, whereas ubiquitously expressed  $\beta$ -arrestins 1 and 2 regulate many 7TM receptors. First characterized as blocking signal transduction by preventing interaction between receptor cytoplasmic domains and heterotrimeric G proteins, arrestins are now known to participate in endocytosis and signaling of 7TM receptors, e.g., by linking them to the endocytic internalization machinery (1, 2). Importantly, both ubiquitination and dephosphorylation of  $\beta$ -arrestins appear essential to agonist-dependent receptor endocytosis (3, 4). Although fungal 7TM receptors have been characterized in fungi (e.g., ref. 5), experimentally documented arrestins have only been identified in metazoa.

In the fungus *Aspergillus nidulans*, alkaline ambient pH results in two-step proteolytic processing activation of the transcription factor PacC, mediating gene regulation by ambient pH (6, 7). pH signal transduction, largely conserved in the fungal kingdom, involves six components: PalA, PalB, PalC, PalF, PalH, and PalI. PalH (Fig. 1A) is a 7TM protein candidate for ambient pH sensor (8), possibly in cooperation with the 4TM PalI (7). PalA is a BRO1 domain-containing protein, which binds two YPXL/I (X = any amino acid) motifs in PacC and is required for the ambient pH-dependent first PacC proteolytic cleavage, probably catalyzed by the calpain-like cysteine protease PalB (9–11). The roles of PalC and PalF remain elusive (7).

Endocytic trafficking, plasma membrane to endosome, is almost certainly involved in fungal ambient pH signal transduc-

tion. PalA and its yeast Rim20 ortholog interact with Vps32 (10, 12), a component of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)-III, one of three multiprotein complexes associating with the membrane of the late endosome to mediate sorting of ubiquitinated cargoes into the multivesicular body pathway (13). In *Saccharomyces cerevisiae*, many multivesicular body pathway components, including Vps32, are required for pH signaling (12). The links between ambient pH signal reception and pH signaling multivesicular body components are unknown.

Here we show that PalF is a non-metazoan member of the arrestin family and that it interacts with the C-terminal cytoplasmic tail of PalH to mediate pH signaling. Like mammalian  $\beta$ -arrestins, PalF is phosphorylated and ubiquitinated, both posttranslational modifications being regulated in a signal-dependent manner. These data implicate PalF as the possible link between ambient pH sensor(s) and late endosome components.

## Materials and Methods

**A. *nidulans* Techniques.** *A. nidulans* strains carried markers in standard use (14). Phenotypic testing of *palH* mutations followed (15). In pH shift experiments, mycelia were grown for 17 h at 37°C in *Aspergillus* minimal medium (16) containing 1% (wt/vol) D-glucose and 5 mM ammonium(+)tartrate, buffered at pH 4 with 50 mM sodium citrate, and shifted for 30 min to the same medium buffered at pH 8.7 with 100 mM Hepes-NaOH. Final pH values before and after the shift were  $\approx$ 3.8 and 8.4, respectively.

Selection of *palF58* and *palF60* was described in ref. 15. The *palF58* T1084C mutation results in a Ser86Pro substitution. The *palF60* T1820A mutation results in Ile331Lys substitution. *palF15* (17), used in construction of the *palF::HA*<sub>3</sub> allele by gene replacement, has the T1394G mutation, changing the Leu-189 codon into a TGA stop codon. UV-induced *palH420* was selected in a diploid of genotype *pabaA1 yA2 aroC660 palH72 camC108; areA'5; pantoB100/areA'5; inoB2; glrA1; fwA1* as allowing usage of 5 mM  $\gamma$ -aminobutyrate as nitrogen source (see ref. 15). *palH420* has the nucleotide sequence change C1186GAG truncating PalH after Leu-368 and out-of-frame encodes RGERSLTVMR before a stop codon (18).

To epitope-tag PalF, a NotI restriction site was engineered after *palF* codon 185 and used to introduce, as a *NotI* fragment obtained from pGTEP1 (19), a sequence encoding a triple hemagglutinin (HA) epitope tag. The resulting (HA)<sub>3</sub>-tagged PalF contains the triple epitope inserted into a region corresponding to the loop connecting  $\beta$ -strands 9 and 10 in bovine visual arrestin (Fig. 2). *palF::HA*<sub>3</sub> was introduced into *A. nidulans*

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: PFAM, Protein Families Database of Alignments and Hidden Markov Models; HA, hemagglutinin; GAD, Gal4 activation domain; 7TM, seven-transmembrane; ESCRT, endosomal sorting complexes required for transport.

<sup>†</sup>Present address: Laboratory of Biochemical Genetics and Metabolism, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York, NY 10021.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: ovincent@cib.csic.es.

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

by replacing the loss-of-function *palF15* allele, using direct selection of *pal*<sup>+</sup> transformants at pH 8.5 (8). The homologous recombination event was confirmed by PCR and Southern analysis. PalF-(HA)<sub>3</sub> allows normal growth at alkaline pH and WT responses to molybdate and neomycin toxicities (20). *pal* loss-of-function mutant strains (*palH17*, *palI32*, *palA1*, *palB7*, and *palC4*) expressing PalF-(HA)<sub>3</sub> were obtained by crossing.

**Sequence Analysis.** Amino acid sequence alignments involving arrestin Protein Families Database of Alignments and Hidden Markov Models (PFAM) domains were made with T-Coffee (21). The Uniprot accession nos. for amino acid sequences are P08168 (bovine visual arrestin), P49407 (human  $\beta$ 1 arrestin), P78612 and Q9P904 (*A. nidulans* PalF and PalH, respectively), Q9URQ4 and P48565 (*S. cerevisiae* Rim8p and Rim21p, respectively), Q9UVF5 and Q9UVF6 (*Yarrowia lipolytica* Rim8 and Rim21, respectively), and Q9UW13 (*Candida albicans* Rim8). *C. albicans* Rim21 was obtained from the *Candida* Genome Database (available at [www.candidagenome.org](http://www.candidagenome.org)).

**Plasmids.** Plasmids encoding GST–PalF or LexA–PalF fusion proteins were constructed by inserting a PCR fragment containing the PalF coding sequence into the EcoRI site of pGEX-2T, pLexA (1–202)+PL (22), or pBTM116 (23). Plasmids encoding GST–PalF mutants carrying Ser86Pro and Ile331Lys PalF substitutions were obtained by mutagenic PCR. A plasmid encoding GST–PalA has been described (10). The construct encoding the PalH cytoplasmic tail tagged with triple Myc [3MYC–PalH (349–760)] was derived from pGBKT7 (Clontech) by inserting a PCR fragment containing the corresponding *palH*-coding region into its single BamHI site. Plasmids encoding truncated derivatives of LexA–PalF and Gal4 activation domain (GAD)–PalH were constructed by inserting PCR or restriction fragments containing the corresponding *palF* and *palH* coding sequences in the polylinker of pLexA (1–202)+PL and pACTII (Clontech), respectively. The *palH* mutation resulting in the Gly369Ala substitution was obtained by using mutagenic PCR.

**Two-Hybrid Analysis.** The two-hybrid screen for LexA–PalF-interacting proteins (from a pBTM116 derivative, see above) was carried out in *S. cerevisiae* TAT7 (*MAT $\alpha$  ade2–101 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1 trp1- $\Delta$ 901 gal4 gal80 LYS2::lexAop-HIS3 URA3::lexAop-lacZ*) cotransformed with an *A. nidulans* cDNA library ligated into pAD-GAL4 (from Stephen Osmani, Ohio State University, Columbus, OH). His<sup>+</sup> transformants were selected in the presence of 5 mM 3-aminotriazole and subsequently screened for  $\beta$ -galactosidase activity by using a filter assay (24). Two-hybrid mapping analysis of PalF and PalH interaction domains was carried out in CTY10.5d (*Mata ade2–101 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1 trp1- $\Delta$ 901 gal4 gal80 URA3::lexAop-lacZ*) with pLexA (1–202)+PL and pACT2 plasmid derivatives.  $\beta$ -galactosidase was quantitatively assayed in permeabilized yeast cells grown to mid-log phase in selective SD (synthetic dextrose) medium (25) and expressed in Miller units (26) as the average of four independent transformants. SEs were <17%. Similar levels of expression for LexA–PalF and LexA–PalF (212–775) were determined by immunoblotting by analysis using anti-LexA rabbit antiserum (Invitrogen) and for GAD–PalH (349–530)<sup>G369A</sup> and GAD–PalH (349–530) using anti-HA Ab (Roche).

**Pull-Down Assays.** Recombinant GST–PalF, GST–PaF(S86P), GST–PalF(I331K), and GST–PalA were purified from *Escherichia coli* DH1 cells as described (10). [<sup>35</sup>S]-3MYC-tagged PalH (349–760) was synthesized *in vitro* by using the Promega TNT system in the presence of [<sup>35</sup>S]methionine [1,000 Ci/mmol (1 Ci = 37 GBq)]. Sepharose beads loaded with GST fusion proteins were incubated with 5 ml of labeling reaction mixture

for 1 h at 4°C in 500  $\mu$ l of STE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0/1 mM EDTA/150 mM NaCl) with 1% (vol/vol) Triton X-100, washed extensively, and boiled in sample buffer. Bound proteins were separated by 7.5% SDS/PAGE and detected by autoradiography (labeled preys) or Coomassie staining (baits).

**Immunoblots.** Lyophilized *A. nidulans* mycelia (0.3 g) were ground with a 4-mm ceramic bead for 15 s in a FastPrep apparatus (power setting 4, model BIO101, (Q-BIOgene, Irvine, CA) and resuspended in 1.7 ml of extraction buffer (50 mM Hepes, pH 7.5/150 mM NaCl/0.1% Triton X-100/1 mM DTT/10% glycerol) containing Complete protease inhibitor mixture (Roche) and 5 mM *N*-ethylmaleimide. Protein extracts were prepared by glass bead homogenization (20 s in a FastPrep apparatus at power setting 6) and clarified after microcentrifugation at 14,000 rpm and 4°C for 30 min in an Eppendorf microcentrifuge. PalF-(HA)<sub>3</sub> was immunoprecipitated from crude extracts (4 mg) by incubation with 20  $\mu$ l of anti-HA affinity matrix (Roche) for 1 h on a rotating wheel and immunoblotted by using anti-HA at 1:1,000 (3F10, Roche) or anti-ubiquitin at 1:1,000 (P4D1, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) Ab, peroxidase-coupled secondary Ab, and enhanced chemiluminescence (ECL-plus, Amersham Pharmacia). The  $\lambda$  phosphatase treatment of PalF-(HA)<sub>3</sub> immunoprecipitates was carried out for 30 min at 37°C in 100- $\mu$ l reaction mixtures containing 2 mM MnCl<sub>2</sub> and 400 milliunits of  $\lambda$  phosphatase (Biolabs, Northbrook, IL). Where indicated, 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> was used as phosphatase inhibitor.

## Results

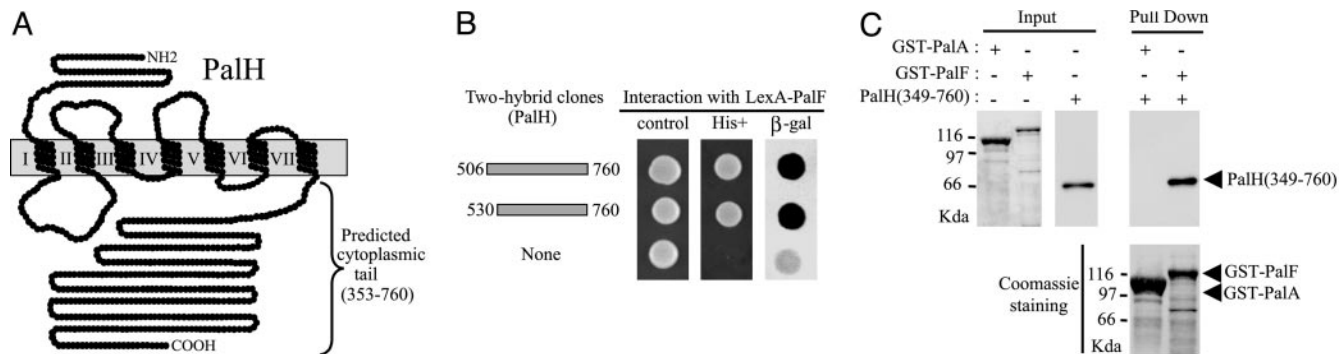
### PalF Binds to the C-Terminal Cytoplasmic Tail of the 7TM Protein PalH.

Using a LexA–PalF fusion protein bait to screen an *A. nidulans* two-hybrid cDNA library, we obtained, among  $2 \times 10^6$  colonies screened, three strong interactors, all containing PalH C-terminal cytoplasmic tail codons 506–760 as well as two slightly weaker interactors containing PalH codons 530–760 (Fig. 1B). Binding of PalF to PalH is direct, as shown by GST pull-down assays by using purified bacterially expressed GST-fusion proteins as baits and *in vitro* synthesized [<sup>35</sup>S]-labeled PalH (349–760) as prey (Fig. 1C). In contrast to the efficient GST–PalF bait, a control GST–PalA fusion was ineffective, demonstrating that the PalF–PalH interaction is specific.

**PalF Is a Fungal Arrestin-Related Protein.** Although previous sequence analyses of PalF family members failed to reveal significant similarity to proteins of known function (7), PFAM database searches revealed the presence of arrestin N-terminal (PFAM 00339) and C-terminal (PFAM 02752) domains in PalF ( $E = 2.3e^{-0.6}$  and  $5.7e^{-18}$ , respectively) (Fig. 2A) and its yeast Rim8 orthologs. Sequence similarity (Fig. 2) is restricted to short stretches of amino acid sequence, mostly corresponding to  $\beta$ -strands in visual arrestin crystal structures (27, 28) and in the predicted secondary structure of PalF. PalF family member regions corresponding to interconnecting loops in arrestins are very divergent in length and sequence, including an  $\approx$ 175-residue insertion in *Y. lipolytica* Rim8 (Fig. 2). Together with PalF–PalH interaction data, this sequence similarity strongly supports a structural relationship between PalF family members and mammalian arrestins and thus designation of PalF as a fungal arrestin-related protein.

**The PalF–PalH Interaction Involves the Arrestin N-Domain Containing Moiety of PalF and Two Regions of the PalH Cytoplasmic Tail.** Analysis of truncated and chimeric mammalian arrestins showed that the N-domain is directly involved in 7TM receptor binding, although additional determinants in the C-domain participate in receptor recognition (29, 30). Two-hybrid mapping showed that the PalF PFAM arrestin N-domain plus 63 additional N-terminal residues

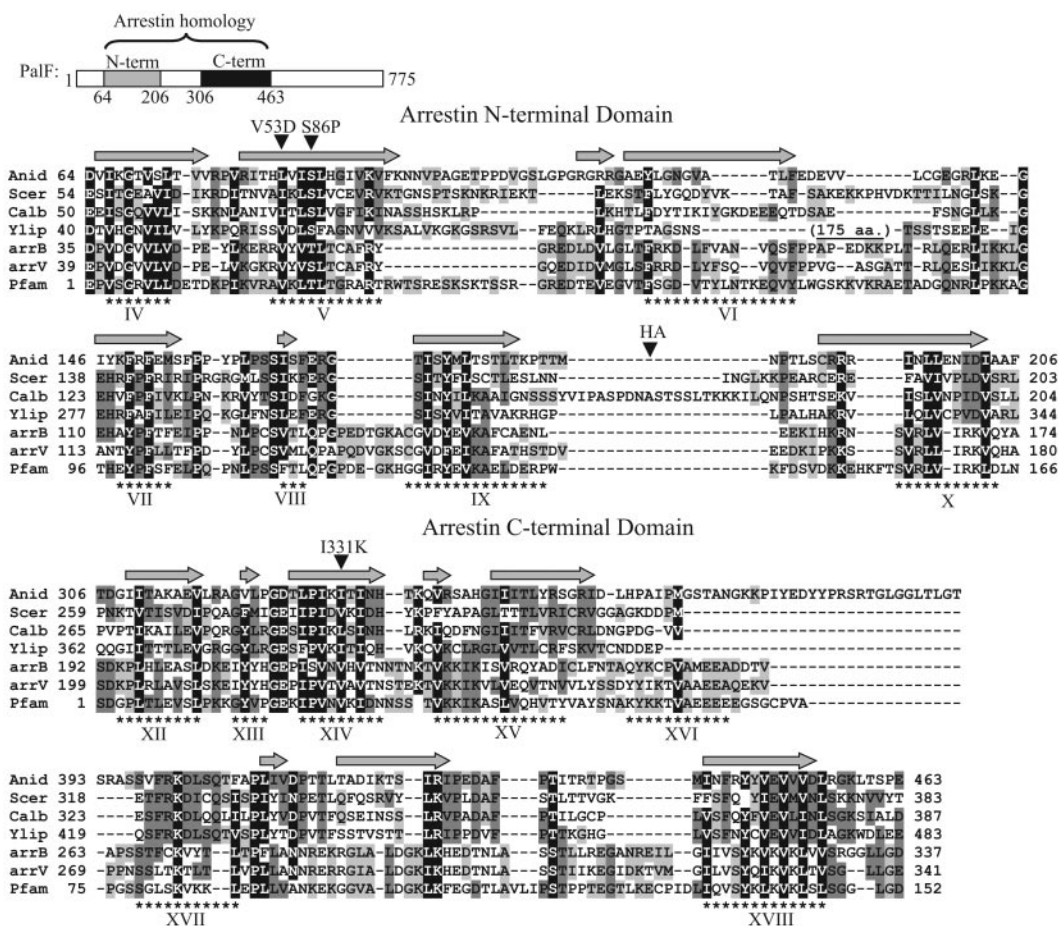




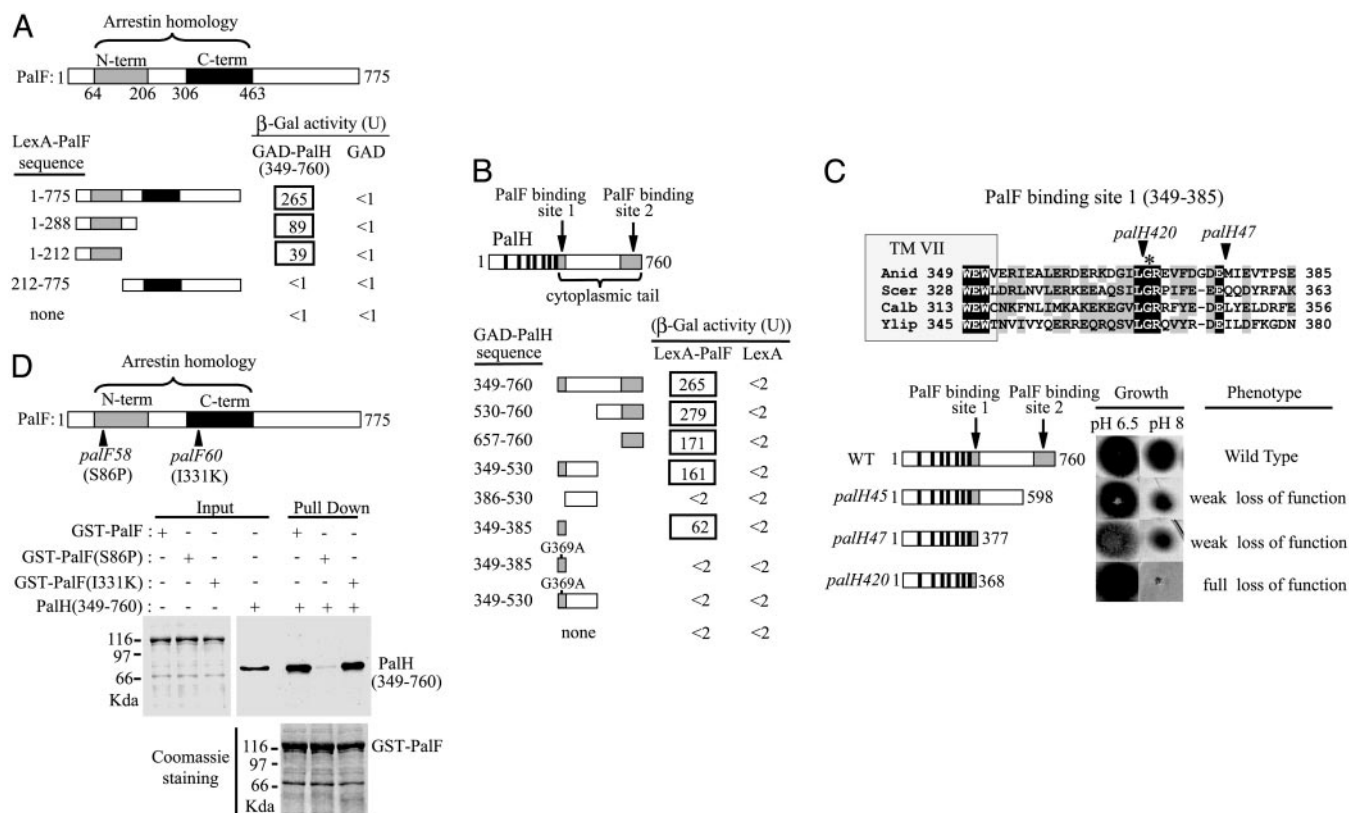
**Fig. 1.** Interaction of PalF with the PalH C-terminal cytoplasmic tail. (A) Predicted PalH seven-pass topology and C-terminal cytoplasmic tail. (B) Overlapping fragments of the PalH cytoplasmic tail obtained in two-hybrid screening by using PalF bait. Positive interactions were revealed by growth of *S. cerevisiae* TAT7 on histidine-free medium containing 5 mM 3-aminotriazole (His<sup>+</sup>) and  $\beta$ -galactosidase lift filter assays ( $\beta$ -gal). (C) *In vitro* binding of PalF to the PalH cytoplasmic tail. GST-PalF or GST-PalA was immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with *in-vitro*-synthesized [<sup>35</sup>S]PalH (349–760). Pulled down proteins were electrophoresed on 10% SDS/polyacrylamide and detected by autoradiography (Upper) and Coomassie staining (Lower). Input: purified GST fusion proteins (Coomassie) or [<sup>35</sup>S]PalH (349–760) (autoradiography) used for binding experiments (20% of the total reaction mixture).

are sufficient for PalH interaction whereas a region containing the PFAM arrestin C-domain has no detectable binding activity (Fig. 3A). In contrast, two regions of the PalH cytoplasmic tail

(residues 349–385 and 657–760) are able to interact with PalF (Fig. 3B). The more N-terminal 37-residue region, beginning shortly before the end of the seventh predicted transmembrane



**Fig. 2.** Conservation of the PalF family arrestin N-terminal and C-terminal domains. Shown above are positions of the PalF PFAM arrestin N-terminal (shaded bar) and C-terminal (solid bar) domains. The alignment includes amino acid sequences from PalF (Anid, *A. nidulans*); Rim8 (Scer, *S. cerevisiae*); Calb, *C. albicans*; Ylip, *Y. lipolytica*), human arrestin  $\beta$  1 (arrB), and bovine visual arrestin (arrV) and the *consensi* for arrestin N-terminal and C-terminal PFAM domains. Conserved (BLOSUM62) residues were shaded according to degree of conservation: black, >90%; dark gray, 50–90%; light gray, 30–50%. Numbers indicate amino acid positions. Dashes indicate gaps. Asterisks indicate positions of  $\beta$ -strands (Roman numerals) in the crystal structure of bovine visual arrestin (27). Gray arrows indicate predicted  $\beta$ -strands in PalF according to the PredictProtein database search engine ([www.predictprotein.org](http://www.predictprotein.org)). Positions of the Val53Asp (V53D) substitution in arrestin  $\beta$  1, Ser86Pro (S86P), and Ile331Lys (I331K) substitutions in PalF, and the (HA)<sub>3</sub> tag in PalF-(HA)<sub>3</sub>, are indicated.



**Fig. 3.** Mutational analysis of the interaction between PalF and PalH. (A and B) Two-hybrid mapping of the PalF- and PalH-interacting domains. (A) LexA-PalF fusions containing indicated PalF residues were tested for interaction with GAD-PalH (349–760) or GAD alone. N-term (shaded bar) and C-term (solid bar) indicate PalF PFAM arrestin N-terminal and C-terminal domains, respectively. (B) GAD-PalH fusions containing indicated PalH residues were tested for interaction with LexA-PalF or LexA alone. Solid bars indicate the positions of PalH-predicted transmembrane helix (8), and shaded bars indicate the two PalF-binding sites. (C) Phenotypic analysis of *palH* mutations affecting the PalF-binding sites. The sequence alignment including *A. nidulans* PalH and *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*, and *C. albicans* Rim21 shows the PalF-binding site located immediately downstream of the seventh PalH TM helix (TM VII). (Upper) Fully conserved (black shading) or similar (BLOSUM62, gray shading) residues are shown. Arrowheads indicate positions of the truncation sites in *palH420* and *palH47* mutant proteins. Fully conserved PalH Gly-369, crucial for PalF–PalH interaction, is denoted by an asterisk. Numbers at the ends indicate residue positions. (Lower Right) A phenotypic analysis of *palH* mutant strains (8, 18) grown on synthetic media at the indicated pH values. (Lower Left) Schematic representation of truncated proteins. Filled boxes and solid bars are as in B. Numbers on the right show the final in-frame encoded residues of the truncated proteins. (D) *In vitro* binding of *palF58* (S86P) and *palF60* (I331K) proteins to the C-terminal region of PalH. Pull-down assays were as in Fig. 1.

helix shows significant conservation between PalH, its yeast Rim21 orthologs, and the likely Rim21 paralog Dfg16 (31) within their otherwise highly divergent C-terminal moieties (Fig. 3C and data not shown). Substitution of the completely conserved Gly-369 by Ala, although not affecting immunoblot-determined GAD-PalH (349–530) levels (data not shown), abolished the two-hybrid interaction (Fig. 3B).

#### The Interaction of PalF with PalH Mediates pH Signaling *In Vivo*.

Mutant phenotypes confirm the physiological importance of the PalF–PalH interaction. Mutations abolishing pH signal transduction lead to, among other phenotypic features, inability to grow at alkaline pH (reviewed in ref. 7). As reported (8), PalH truncation after residues 598 (*palH45*) or 377 (*palH47*) partially impairs growth at pH 8 (Fig. 3C). These mutations remove the C-terminal PalF-binding site (657–760) but leave fully or mainly intact the N-terminal site (349–385) (Fig. 3C). PalH truncation after residue 368 (*palH420*), nearly halving the N-terminal site and removing the crucial Gly-369, completely prevents growth at pH 8 (Fig. 3C). Substitution of the highly conserved Ser-86 by Pro (Fig. 2) in the loss-of-function *palF58* mutant almost completely prevents PalF–PalH interaction *in vitro* (Fig. 3D), underlining the physiological importance of the interaction and the PalF arrestin N-domain in enabling it. Substitution of the highly conserved Ile-331 residue in the arrestin C-domain (Fig. 2) by

Lys (*palF60*) did not affect *in vitro* interaction (Fig. 3D), suggesting that its loss-of-function phenotype is unrelated to the interaction.

#### PalF Is Phosphorylated and Ubiquitinated in Response to Alkaline pH

in a PalH- and PalI-Dependent Manner. Because the function of mammalian  $\beta$ -arrestins in agonist-dependent receptor endocytosis is regulated through phosphorylation and ubiquitination (3, 4), a phenotypically WT (data not shown) epitope (HA)<sub>3</sub> tagged, gene replacement *palF* allele was used to monitor PalF posttranslational modification. Anti-HA Western blot analysis of protein extracts prepared from mycelial cells after mechanical cell wall and membrane disruption detected two immunoreactive bands in acidic grown WT (Fig. 4A, lane 1), which were absent in untagged cell extracts (data not shown). Inspection of the *palF* 5'-UTR and coding regions indicates that alternative translation initiation sites cannot be responsible. We determined that the faster, less prominent band is almost undetectable when crude protoplast extracts were analyzed (data not shown), indicating that this faster band represents a degradation product. Shifting acidic-grown mycelia to alkaline pH resulted in decreased mobility of both bands (Fig. 4A, lane 2), attributable to phosphorylation as it is reversed by  $\lambda$  phosphatase, as shown by comigration of dephosphorylated species with those preceding alkaline pH activation (Fig. 4B). Alkaline





failure of extensive genetic screens carried out for the pal pathway in *A. nidulans* and for the homologous Rim pathways in *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica* to reveal involvement of G-proteins in pH regulation suggests that these proteins are not required for ambient pH signaling.

The positive role of PalF in pH signal transduction and its mediation by interaction with PalH, together with the apparent absence of G protein involvement in pH signaling, strongly suggests that PalF, contrary to mammalian arrestins, does not play a role in receptor desensitization. However, evidence suggests that the signaling function of PalF is related to endocytic trafficking: (i) fungal pH signaling involves most of the components of the endosomal ESCRT complexes (12), and (ii) PalF is phosphorylated and ubiquitinated in a pH- and PalH-dependent manner, thus resembling many yeast plasma membrane proteins whose endocytosis requires phosphorylation and subsequent ubiquitination (36). The effect of *pal* mutations on PalF phosphorylation and ubiquitination indicates that PalH and PalI act upstream in the signaling pathway whereas PalA, PalB, and PalC act downstream, which, together with the involvement of endosome ESCRT complexes in pH signaling (12), leads to the model in Fig. 4F.

Despite the mechanistic novelty of the fungal pH signal transduction pathway, this work strengthens the possibility that this pathway and Hedgehog signaling in metazoa share common ancestry (37). Both pathways involve 7TM proteins (PalH and Smoothened), apparently unrelated in amino acid sequence, without compelling evidence for G protein involvement (38). Signaling is mediated by arrestins (PalF and  $\beta$ -arrestin 2) (this work and refs. 39 and 40) and apparently involves endocytic trafficking to the late endosome (12, 41). Finally, signaling in both cases leads to proteolytic processing of the transcription factors (PacC and Cubitus interruptus/Gli), which appear related evolutionarily in their zinc finger DNA-binding domains (37).

We thank Joan Tilburn (Imperial College) and Eduardo Espeso (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) for helpful discussions and useful materials, E. Reoyo and L. Stanton for technical assistance, and Steve Osmani for his generous gift of the *A. nidulans* two-hybrid library. This work was supported by Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia Grants BIO2002-00803 (to O.V.) and BIO2003-0077 (to M.A.P.) and Wellcome Trust Grant 067878 (to H.N.A.). O.V. is currently supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain Ramón y Cajal Program. S.H. held a Plan de Formación de Personal Investigador Studentship.

- Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. (2003) *Biochem. J.* **375**, 503–515.
- Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. (2005) *Science* **308**, 512–517.
- Lin, F. T., Krueger, K. M., Kendall, H. E., Daaka, Y., Fredericks, Z. L., Pitcher, J. A. & Lefkowitz, R. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 31051–31057.
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. (2001) *Science* **294**, 1307–1313.
- Verselle, M., Lemaire, K. & Thevelein, J. M. (2001) *EMBO Rep.* **2**, 574–579.
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, H. N., Jr. & Peñalva, M. A. (1995) *Genes Dev.* **9**, 1622–1632.
- Peñalva, M. A. & Arst, H. N., Jr. (2004) *Ann. Rev. Microbiol.* **58**, 425–451.
- Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Díez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., Espeso, E. A., Peñalva, M. A. & Arst, H. N., Jr. (1999) *Mol. Microbiol.* **33**, 994–1003.
- Díez, E., Álvaro, J., Espeso, E. A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr. & Peñalva, M. A. (2002) *EMBO J.* **21**, 1350–1359.
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H. N., Jr. & Peñalva, M. A. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1647–1655.
- Xu, W. & Mitchell, A. P. (2001) *J. Bacteriol.* **183**, 6917–6923.
- Xu, W., Smith, F. J., Jr., Subaran, R. & Mitchell, A. P. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 5528–5537.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G. & Emr, S. D. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 893–905.
- Clutterbuck, A. J. (1993) in *Genetic Maps: Locus Maps of Complex Genomes*, ed. O'Brien, S. J. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp 3.71–3.84.
- Arst, H. N., Jr., Bignell, E. & Tilburn, J. (1994) *Mol. Gen. Genet.* **245**, 787–790.
- Cove, D. J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 51–56.
- Dorn, G. (1965) *Genet. Res.* **6**, 13–26.
- Rudnicka, J. D. (2004) Ph.D. thesis (University of London, London).
- Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R. & Futcher, B. (1992) *EMBO J.* **11**, 1773–1784.
- Caddick, M. X., Brownlee, A. G. & Arst, H. N., Jr. (1986) *Mol. Gen. Genet.* **203**, 346–353.
- Notredame, C., Higgins, D. G. & Heringa, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **302**, 205–217.
- Ruden, D. M., Ma, J., Li, Y., Wood, K. & Ptashne, M. (1991) *Nature* **350**, 250–252.
- Fields, S. & Song, O. (1989) *Nature* **340**, 245–246.
- Yang, X., Hubbard, E. J. & Carlson, M. (1992) *Science* **257**, 680–682.
- Rose, M. D., Winston, F. & Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
- Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V. & Sigler, P. B. (1999) *Cell* **97**, 257–269.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H. W., Labahn, J., Krafft, B. & Buldt, G. (1998) *Nature* **391**, 918–921.
- Gurevich, V. V., Dion, S. B., Onorato, J. J., Ptasiński, J., Kim, C. M., Sterne-Marr, R., Hosey, M. M. & Benovic, J. L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 720–731.
- Vishnivetskiy, S. A., Hosey, M. M., Benovic, J. L. & Gurevich, V. V. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 1262–1268.
- Barwell, K. J., Boysen, J. H., Xu, W. & Mitchell, A. P. (2005) *Eukaryotic Cell* **4**, 890–899.
- Krupnick, J. G., Santini, F., Gagnon, A. W., Keen, J. H. & Benovic, J. L. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32507–32512.
- Han, M., Gurevich, V. V., Vishnivetskiy, S. A., Sigler, P. B. & Schubert, C. (2001) *Structure (London)* **9**, 869–880.
- DeGraff, J. L., Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43247–43252.
- Galliera, E., Jala, V. R., Trent, J. O., Bonocchi, R., Signorelli, P., Lefkowitz, R. J., Mantovani, A., Locati, M. & Haribabu, B. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 25590–25597.
- Hicke, L. (1999) *Trends Cell Biol.* **9**, 107–112.
- Arst, H. N., Jr. & Peñalva, M. A. (2003) *Trends Genet.* **19**, 224–231.
- Kalderon, D. (2005) *Curr. Biol.* **15**, R175–R178.
- Chen, W., Ren, X. R., Nelson, C. D., Barak, L. S., Chen, J. K., Beachy, P. A., de Sauvage, F. & Lefkowitz, R. J. (2004) *Science* **306**, 2257–2260.
- Wilbanks, A. M., Fralish, G. B., Kirby, M. L., Barak, L. S., Li, Y. X. & Caron, M. G. (2004) *Science* **306**, 2264–2267.
- Incardona, J. P., Gruenberg, J. & Roelink, H. (2002) *Curr. Biol.* **12**, 983–995.

## Recruitment of the ESCRT Machinery to a Putative Seven-Transmembrane-Domain Receptor Is Mediated by an Arrestin-Related Protein<sup>∇</sup>

Antonio Herrador, Silvia Herranz, David Lara, and Olivier Vincent\*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, 28029 Madrid, Spain*

Received 29 January 2009/Returned for modification 20 April 2009/Accepted 8 December 2009

**Mammalian arrestins have a major role in the intracellular trafficking of seven-transmembrane (7TM) receptors. The fungal ambient pH signaling pathway involves an arrestin-related protein, PalF/Rim8, and the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) machinery. We found that in *Saccharomyces cerevisiae*, Rim8 binds to both the putative 7TM pH sensor Rim21 and the ESCRT-I subunit Vps23. We show that an SXP motif in Rim8 mediates binding to the Vps23 ubiquitin E2 variant (UEV) domain and that a monoubiquitinated residue near the SXP motif contributes to this interaction. We present evidence that Rim8 ubiquitination is dependent on the Rsp5 E3 ubiquitin ligase and triggered upon binding of Vps23 UEV to both the SXP motif and ubiquitin, thus suggesting a two-step binding mechanism. We further show that Rim8 coimmunoprecipitates with ESCRT-I subunits Vps23 and Vps28, supporting the idea that binding of Rim8 to Vps23 mediates the association of Rim8 with the ESCRT-I complex. Fluorescence microscopic analyses indicate that overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures, providing additional evidence of the interaction between these two proteins. Strikingly, our findings indicate that evolutionary conserved mechanisms control the recruitment of the ESCRT machinery to Pal/Rim proteins in fungi and retroviral Gag proteins in animal cells.**

Arrestins play an essential role in the regulation of seven-transmembrane (7TM) receptors (31). Although initially identified on the basis of their ability to uncouple 7TM receptors from heterotrimeric G proteins in a process known as desensitization, arrestins were later found to serve as endocytic adaptors that recruit clathrin and the clathrin adaptor protein AP-2 and facilitate 7TM receptor internalization via clathrin-coated vesicles (17, 29, 30).

Until recently, arrestins were thought to be restricted to the animal kingdom. However, the identification of an arrestin-related protein in *Aspergillus nidulans*, PalF, demonstrated that members of this protein family are also present in fungi (22). PalF and its yeast homolog Rim8 are involved in the Pal/Rim signaling pathway, which mediates the ambient pH response and is activated in neutral-alkaline environments (41). As mammalian beta-arrestins, PalF, which contains arrestin N-terminal and C-terminal domains, binds to the cytoplasmic domain of a 7TM protein, the putative pH sensor PalH, and is ubiquitinated in a signal- and 7TM receptor-dependent manner (22).

The PalF/Rim8 signaling function does not appear to be related to receptor desensitization, as there is no evidence of G protein involvement in the Pal/Rim pathway. However, evidence strongly suggests that these proteins, as mammalian beta-arrestins, play a role as endocytic adaptors. Most of the components of the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) machinery involved in the MVB (mul-

tivesicular body) sorting pathway (24, 48), play an essential role in the Pal/Rim signaling pathway (4, 7, 12, 15, 20, 28, 43, 45, 62). According to the current model for the Rim pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, the ESCRT-I and ESCRT-II complexes, together with the Snf7 and Vps20 subunits of ESCRT-III, act downstream of a plasma membrane complex containing the two 7TM proteins Rim21 and Dfg16, Rim8, and probably the 3TM protein Rim9 (41). The prevailing view is that pH signaling requires Rim8-mediated endocytic internalization of Rim21 and/or Dfg16, thus making the connection between the plasma membrane complex and the endosomal ESCRT machinery. Snf7, which oligomerizes upon membrane binding (1, 47, 53), would serve as a docking platform for recruitment of a protein complex that triggers the pH-dependent proteolytic activation of the Rim101 transcription factor by the Rim13 cysteine protease. Rim20, a Bro1 domain-containing protein, mediates the recruitment of Rim101 to Snf7 (61), and evidence suggests that this interaction is a regulated step in the pathway (8).

An important question concerns the molecular mechanisms by which the pH signal is transmitted from the 7TM protein-arrestin complex to the ESCRT-associated Rim101-processing machinery. Intriguingly, Vps27, which mediates the recruitment of ESCRT-I to endocytic cargos, is not required for pH signal transduction, suggesting that a Rim pathway-specific protein may substitute Vps27 for ESCRT-I recruitment (45, 62).

Here, we present genetic and biochemical evidence that in *S. cerevisiae*, the arrestin-related protein Rim8 mediates the recruitment of ESCRT-I to the 7TM protein Rim21. Rim8 binds to both Rim21 and the ESCRT-I subunit Vps23, and we present evidence that an SXP motif and a monoubiquitinated residue in Rim8 contribute to binding to the Vps23 UEV domain. We show that Rim8 ubiquitination is dependent on

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Phone: 34 915854495. Fax: 34 915854401. E-mail: ovincent@iib.uam.es.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 22 December 2009.



the E3 ubiquitin (Ub) ligase Rsp5, which binds a PXY motif in Rim8. We further show that Rim8 associates with both ESCRT-I subunits Vps23 and Vps28 in yeast extracts and that overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures. Our results, therefore, identify a protein of the arrestin family as an adaptor for the recruitment of the ESCRT machinery to a 7TM protein.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains and genetic methods.** The *Saccharomyces cerevisiae* strains were MHY501 (*MAT $\alpha$*  *DOA4 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 ura3-52 lys2-801 trp1-1*) and the isogenic *doa4::LEU2* derivative MHY623 (40), 23346c (*MAT $\alpha$*  *ura3*), and its isogenic derivative 27038a (*MAT $\alpha$*  *ura3 npi1*) (21). The strain Y00000 (BY4741; *MAT $\alpha$*  *his3- $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0*) and isogenic derivatives Y04414 (*rim8 $\Delta$* ), Y01150 (*rim21 $\Delta$* ), Y11806 (*dfg16 $\Delta$* ), Y06196 (*rim9 $\Delta$* ), Y03416 (*vps23 $\Delta$* ), Y07333 (*rim20 $\Delta$* ), Y04752 (*ygr122w $\Delta$* ), Y00936 (*rim101 $\Delta$* ), and Y06643 (*rim13 $\Delta$* ) were obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany). The OVY25 strain expressing hemagglutinin (HA)-tagged RIM101 and the OVY121 strain expressing Flag-tagged VPS28 were constructed by transforming Y04414 (*rim8 $\Delta$* ) with a fragment of plasmid pKR41 and a PCR fragment generated from plasmid pFA6a-6xGLY-3xFLAG-HIS3MX6 (Addgene plasmid 20753), respectively, as previously described (14, 45). CTY10.5d (*MAT $\alpha$*  *ade2-101 his3- $\Delta$ 200 leu2- $\Delta$ 1 trp1- $\Delta$ 901gal4 gal80 URA3::lexAop-lacZ*) (3) and W303-1A (*MAT $\alpha$*  *trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 ade2-1 can1-100*) were used for two-hybrid and fluorescence microscopy experiments, respectively. Standard genetic methods were followed, and yeast cultures were grown in synthetic dextrose (SD) medium lacking appropriate amino acids to maintain selection for plasmids (44). Growth tests on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) plates containing 200 mM LiCl have been described elsewhere (15).

**Plasmids.** Plasmids encoding Gal4 activation domain (GAD)-Vps23 and GAD-Rim21Cterm were constructed by cloning the Vps23 open reading frame (ORF) or the Rim21 C-terminal cytoplasmic tail (codons 327 to 534) in the polylinker of pACT2 (Clontech). Plasmids encoding glutathione S-transferase (GST)-Vps23 and GST-Rsp5WW are derivatives of pGEX-5X-1 (Pharmacia) containing the Vps23 ORF and the Rsp5 WW domains (codons 228 to 430), respectively. pADH1-HA-Vps23UEV is a derivative of pWS93 (50) containing the Vps23 UEV domain (codons 1 to 161). Vps23 mutations resulting in a Ser162Stop substitution in GAD-Vps23 and GST-Vps23 and in a Ser55Ala Asp56Ala Gly57Ala triple substitution in GAD-Vps23 and HA-Vps23UEV were obtained by using mutagenic PCR. pVps23-Flag and pVps23-RFP, encoding phenotypically wild-type (WT) (data not shown) Flag- or red fluorescent protein (RFP)-tagged Vps23 under the control of its native promoter, are derivatives of the centromeric plasmid pRS316 and the 2 $\mu$ m high-copy-number plasmid pRS424 (49), respectively. A NotI site was engineered immediately 5' of the stop codon of the Vps23 coding sequence, with a 367-bp 5' sequence and a 128-bp 3' sequence. This site was used to introduce a double-stranded oligonucleotide containing a triple Flag tag or a NotI fragment containing the mCherry RFP sequence. Plasmids encoding LexA-Rim8 and LexA-Rim8(528-542) or 3MYC-Rim8 and 3MYC-Rim8(461-542) were constructed by cloning the corresponding Rim8 coding sequence in pLexA(1-202)+PL (46) or pGBKT7 (Clontech). pFlag-Rim8, pHA-Rim8, and pRim8-HA, encoding phenotypically WT (data not shown) Flag- or HA-tagged Rim8 under the control of its native promoter are derivatives of the centromeric plasmid pRS313 (49) containing the Rim8 coding sequence with a 1,000-bp 5' sequence and a 427-bp 3' sequence. For pHA-Rim8 and pFlag-Rim8, a NotI site was engineered after Rim8 codon 178 and was used to introduce a NotI fragment from pGTPE1 (56) containing a triple HA tag or a double-stranded oligonucleotide containing a triple Flag tag in a region of Rim8 corresponding to the loop connecting  $\beta$  strands 9 and 10 in bovine arrestin (22). The same procedure was used for pRim8-HA, except that the NotI site was created immediately 5' of the stop codon. pRim8-GFP, encoding phenotypically WT (data not shown) green fluorescent protein (GFP)-tagged Rim8, is a derivative of the 2 $\mu$ m high-copy-number plasmid pRS423 containing the same Rim8 fragment as pRim8-HA, except that the NotI fragment containing the triple HA tag was replaced by a NotI fragment from pSFGP1 (27) containing the GFP sequence. pHA-Rim8(U) and pRim8-HA(U) were obtained by cloning the HA-Rim8- or Rim8-HA-containing fragments from pHA-Rim8 or pRim8-HA in pRS316. Rim8 mutations resulting in Pro506Ala, Lys521Arg, Lys527Arg, Pro536Leu, and Val505Stop substitutions or in a Glu533Ala Ser534Ala Asp535Ala Pro536Ala quadruple substitution were obtained by using mutagenic PCR. To construct the plasmid encoding the Flag-Rim8(1-504)-Vps23 chimeric

protein, a NcoI site was engineered after Rim8 codon 504 in pFlag-Rim8 and used to introduce the Vps23 coding sequence. YEp96 (2 $\mu$ m *TRP1* Ub) and YEp112 (2 $\mu$ m *TRP1* HA-Ub) contain synthetic yeast Ub and HA-tagged Ub under the control of the copper-inducible *CUP1* promoter, respectively (23). pCUP1-Ub0K was constructed by replacing the BamHI-KpnI Ub fragment in Yep96 with a fragment from LHP306 containing Ub-no Lys (55). pLGn+3xNRE22D carries a *CYC1-NRE-lacZ* reporter (45).

**$\beta$ -Galactosidase assays.** For two-hybrid analysis, transformants were grown to mid-log phase in a selective SD medium.  $\beta$ -Galactosidase was quantitatively assayed in permeabilized yeast cells grown to mid-log phase in a selective SD medium and expressed in Miller units (35). For analysis of the *CYC1-NRE-lacZ* reporter, transformants were grown in a selective SD medium containing 0.1 M HEPES titrated to pH 7.0 and  $\beta$ -galactosidase activity was assayed with protein extracts prepared by cell disruption with glass beads and normalized to the protein concentration of the extract (18).

**Immunoblot analysis.** Yeast protein extracts were prepared from transformants grown to mid-log phase in a selective SD medium (final pH value, 3.5) and shifted to pH 7 for 30 min by adding 10 mM KOH to activate the Rim pathway. When indicated, protein extracts were prepared before the shift. Protein extracts for Rim101-HA and Flag-Rim8 immunoblot analysis were prepared by a rapid boiling method (57). Protein extracts for HA-tagged Rim8 and Vps23 immunoblot analysis were prepared with immunoprecipitation (IP) buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol [DTT], 10% glycerol, 5 mM *N*-ethylmaleimide, Complete protease inhibitor mixture [Roche]), as described previously for immunoprecipitation assays (57), or by alkaline lysis (59) when indicated. Immunoprecipitation procedures were essentially as described previously (57). Protein lysates (300 to 400  $\mu$ g) were incubated with 20  $\mu$ l of anti-HA (Roche) or anti-Flag (Sigma) affinity matrix for 1 h on a rotating wheel. Total (50  $\mu$ g, or  $1 \times 10^7$  cell equivalents, for rapid boiling and alkaline lysis) and immunoprecipitated extracts were analyzed by 7.5% SDS-PAGE and immunoblotting with monoclonal anti-HA (3F10; Roche) or anti-Flag (M2; Sigma) antibodies (Abs). Antibodies were detected by enhanced chemiluminescence with ECL Plus reagents (Amersham).

**Pull-down assays.** Recombinant GST-Vps23, GST-Vps23UEV, and GST-Rsp5WW were purified from *Escherichia coli* BL21 (Novagen) as described previously (58). [<sup>35</sup>S]3MYC-tagged Rim8, Rim8Cterm (codons 461 to 542), and Rim8 mutant derivatives were synthesized *in vitro* by using the Promega TNT system in the presence of [<sup>35</sup>S]methionine [1,000 Ci/mmol (1 Ci = 37 GBq)]. Sepharose beads loaded with GST fusion proteins were incubated with 5  $\mu$ l of labeling reaction mixture for 1 h at 4°C in 500  $\mu$ l of STE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) with 1% (vol/vol) Triton X-100, washed extensively with the same buffer, and boiled in the sample buffer. Bound proteins were separated by 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography (labeled preys) or Coomassie staining (baits). For pull-down assays with yeast protein extracts, Sepharose beads loaded with GST fusion proteins were incubated in IP buffer with 250  $\mu$ g of protein lysates. Bound proteins were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. For quantitation of percent binding, several autoradiogram exposures of a gel were scanned as TIFF images and analyzed with ImageJ software.

**Fluorescence microscopy.** Yeast strains expressing GFP and RFP fusion proteins were grown to mid-log phase in a selective SD medium. Cells from 1-ml cultures were harvested by centrifugation and resuspended in ~100  $\mu$ l of the residual medium, and 2.5  $\mu$ l of the suspension was placed on a microscope slide. GFP and RFP localization in live cultures was monitored by direct fluorescence within 5 min. Cells were viewed using a Nikon Eclipse 90i fluorescence microscope. Images were captured with a DS-Qi1Mc digital camera (Nikon) using Nis elements BR 3.0 software and processed with ImageJ.

## RESULTS

**An SXP motif at the C terminus of Rim8 mediates its interaction with the ESCRT-I subunit Vps23.** Signal transduction through the Pal/Rim pathway involves a 7TM receptor-arrestin complex and most of the components of the ESCRT machinery but not Vps27, which mediates the recruitment of ESCRT-I to endocytic cargos. We then tested whether the arrestin-related protein Rim8 could substitute Vps27 for recruitment of the ESCRT-I subunit Vps23. Two-hybrid assays revealed a strong interaction between a LexA-Rim8 fusion protein and a fusion of Vps23 to the Gal4 activation domain

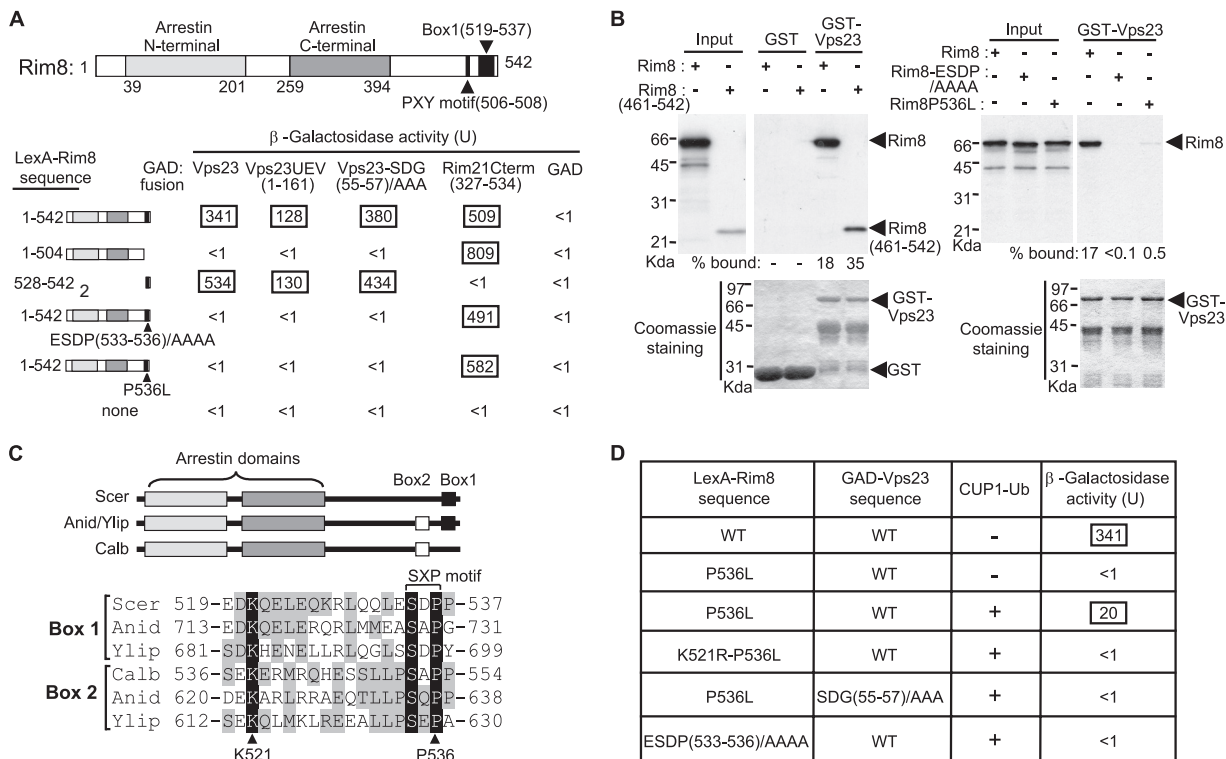


FIG. 1. Interaction of Rim8 with Rim21 and Vps23. (A) Two-hybrid mapping of the Rim8-interacting domains. Shown at the top are positions of the arrestin N-terminal and C-terminal domains, a PXY motif, and the conserved box 1 sequence. LexA-Rim8 fusions containing the indicated Rim8 residues were tested for interaction with GAD-Vps23, GAD-Vps23UEV, GAD-Vps23-SDG(55-57)AAA, GAD-Rim21Cterm, or GAD alone. The strain was CTY10-5d. Values are average  $\beta$ -galactosidase activities for four transformants, and standard errors were <18%. (B) *In vitro* binding of Rim8 to Vps23. GST-Vps23 or GST was immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with *in vitro*-synthesized [<sup>35</sup>S]Rim8 (the wild type or the indicated mutant derivatives) or [<sup>35</sup>S]Rim8(461-542). Pulled down proteins were separated on 10% SDS-PAGE gel and detected by autoradiography (upper) and Coomassie staining (lower). "Input" represents *in vitro*-synthesized proteins used for binding experiments (20% of the total reaction mixture). The percentages of the input bound to GST-Vps23 are indicated. (C) Conservation of box 1 and box 2 sequences in Rim8 family members. Shown at the top is a schematic representation (not to scale) showing the positions of arrestin domains and box 1 and box 2 sequences in Rim8 in *S. cerevisiae* (Scer), *Y. lipolytica* (Ylip), and *C. albicans* (Calb) and PalF in *A. nidulans* (Anid). The alignment shows the related conserved sequences in box 1 and box 2. Fully conserved (black shading) or similar (BLOSUM62; gray shading) residues are shown. The positions of the highly conserved K521 and P536 residues are indicated. (D) Ubiquitin-mediated interaction of Rim8 with Vps23. LexA-Rim8 fusions containing the indicated mutations were tested for two-hybrid interaction in strain CTY10-5d with GAD-Vps23 and the SDG(55-57)AAA mutant derivative in the presence of Yep96 (+) or vector control pRS424 (-). Transformants were grown in the presence of 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> to overexpress Ub from the CUP1 promoter in Yep96. Values are average  $\beta$ -galactosidase activities for four transformants, and standard errors were <18%.

(GAD) (Fig. 1A). Our previous work showed that the Rim8 homolog in *A. nidulans*, PalF, binds directly to the C-terminal cytoplasmic tail of the 7TM protein PalH (22). This interaction is conserved in yeast, as we detected a strong two-hybrid binding between Rim8 and the C-terminal cytoplasmic tail of Rim21 (codons 327 to 534), one of the two PalH homologs in *S. cerevisiae* (Fig. 1A). Thus, Rim8 interacts with both the 7TM protein Rim21 and the ESCRT-I subunit Vps23. Rim8 binds directly to Vps23, as shown by GST pulldown assays with purified, bacterially expressed GST-Vps23 as bait and *in vitro*-synthesized <sup>35</sup>S-labeled Rim8 (Fig. 1B).

Multiple sequence alignment of Rim8 family members did not reveal regions of sequence conservation outside the arrestin domains, with the exception of a short sequence (box 1) at the C terminus of Rim8 in *S. cerevisiae* (Fig. 1C). A related sequence (box 2) is found in *Candida albicans*, whereas both boxes 1 and 2 are present in *A. nidulans* and *Yarrowia lipolytica*. The C-terminal region of Rim8, containing box 1, is necessary

(Fig. 1A) and sufficient (Fig. 1B) for interaction with Vps23. In contrast, the C terminus of Rim8 is not required for binding to the 7TM protein Rim21 (Fig. 1A), as expected from the direct involvement of arrestin domains in the interaction between Rim8 and Rim21 homologs in *A. nidulans* (22). Furthermore, the Vps23 UEV domain (codons 1 to 161) is sufficient for interaction with Rim8 (Fig. 1A).

Previous studies showed that Vps23 UEV interacts with PSDP and PTVP motifs in Vps27 (6, 26). Rim8 box 1 contains a highly conserved SXP motif (SDP; codons 534 to 536) corresponding to a PSXP motif in box 2 (Fig. 1C). We showed that the 15 C-terminal residues of Rim8 (codons 528 to 542), containing the SXP motif, are sufficient for interaction with Vps23 (Fig. 1A) and that substitution of four alanine residues in place of the ESDP sequence (codons 533 to 536) containing the SXP motif abolished both two-hybrid interaction and *in vitro* binding between Rim8 and Vps23 (Fig. 1A and B). As expected, the ESDP/AAA substitution did not impair the interaction

between Rim8 and the 7TM protein Rim21 (Fig. 1A). A previous study showed that binding of the mammalian Vps23 homolog, Tsg101, to the related P(T/S)AP motif in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag protein is strongly dependent on the second Pro residue in this motif, as its replacement by a Leu residue significantly reduced Tsg101 UEV binding (16). We found that Rim8-Vps23 two-hybrid interaction was also disrupted upon replacement of the Pro536 residue with Leu in the SXP motif (Fig. 1A). However, in contrast to the ESDP(533-536)/AAA mutation, the Pro536Leu substitution allowed some residual binding to Vps23 in pulldown assays (Fig. 1B), thus suggesting that this mutation does not fully inactivate the SXP motif. Together, these findings indicate that the conserved SXP motif in Rim8 box 1 is a Vps23-binding site.

**The Rim8 C terminus is monoubiquitinated at residue K521.** Rim8 box 1 contains a highly conserved Lys residue (K521) located 12 residues upstream of the SXP motif (Fig. 1C). Because the Rim8 homolog in *A. nidulans* is ubiquitinated (22), we wondered whether K521 might be a ubiquitination site. To test whether Rim8 is ubiquitinated, we examined by immunoblot analysis either Flag- or HA-tagged Rim8, expressed from its own promoter, on a centromeric plasmid. Anti-Flag immunoblot analysis of Flag-tagged Rim8 immunoprecipitates detected a major band migrating at 82 kDa and a minor band of lower-level mobility (Fig. 2A, upper panel, lane 1). We showed that the band of lower-level mobility markedly increases and is up-shifted upon overexpression of HA-tagged Ub (Fig. 2A, upper panel, lane 2). This band corresponds to an HA-Ub conjugate as it yields detectable HA immunoreactivity (Fig. 2A, lower panel). Thus, Rim8, as PalF of *A. nidulans*, is ubiquitinated. Unexpectedly, we found that Rim8, in contrast to PalF, is ubiquitinated in a pH signal-independent manner (Fig. 2B), although increased ambient pH activates the Rim pathway leading to Rim101 processing (Fig. 2C). In addition, ubiquitinated Rim8 levels remained unchanged over 3 h following a shift from either pH 3.5 to pH 7 or pH 7 to pH 3.5 (data not shown).

A previous study showed that the pool of free Ub in the cell, which is depleted in a *doa4Δ* mutant, can be restored to wild-type levels by expressing Ub under the *CUP1* promoter without adding extra copper to the medium (38). In agreement with this study, immunoblot analysis of HA-Rim8 showed that ubiquitinated Rim8 is undetectable in a *doa4Δ* mutant and restored upon expression of Ub from the *CUP1* promoter in the absence of extra copper (Fig. 2D, upper panel, lanes 2 and 3). The same result was obtained when Ub lacking all of its Lys residues (Ub0K), which prevents the formation of polyubiquitin chains, was expressed (Fig. 2D, upper panel, lane 4), indicating that the band of lower-level mobility detected in the wild-type strain represents monoubiquitinated Rim8. Control experiments showed that overexpression of Ub upon addition of extra copper to the medium results in the formation of an additional band, which is not detected when Ub0K is overexpressed (Fig. 2D, lower panel, lanes 3 and 4). This band is presumed, owing to its size, to be diubiquitinated Rim8, which is consistent with the previously reported accumulation of di-Ub species upon Ub overexpression in a *doa4Δ* mutant (38). We next examined whether the conserved K521 residue in Rim8 box 1 is involved in Rim8 ubiquitination. Immunoblot analysis of HA-Rim8 showed that a Lys521Arg

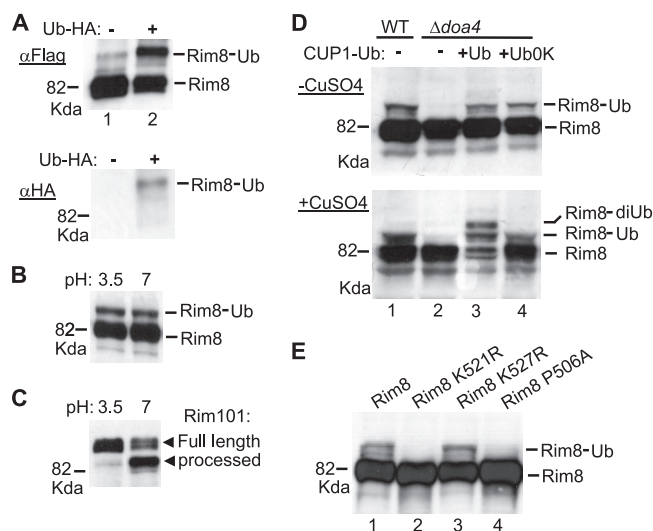


FIG. 2. Monoubiquitination of Rim8 at K521. (A to E) Western blot analysis of epitope-tagged Rim8. The position of ubiquitinated Rim8 (Ub) is indicated. (A) MHY501 (WT) was cotransformed with pFlag-Rim8 and either Yep112 (+) or vector control pRS424 (-) and grown in the presence of 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> to overexpress HA-tagged Ub from the *CUP1* promoter in Yep112. Anti-Flag ( $\alpha$ Flag)-immunoprecipitated protein extracts were immunoblotted with anti-Flag (upper panel) or anti-HA (lower panel) Ab. (B) Y04414 (*rim8Δ*) was transformed with pHA-Rim8, and protein extracts made by alkaline lysis before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 were immunoblotted with anti-HA Ab. (C) OY25 (*rim8Δ RIM101-HA*) was transformed with pFlag-Rim8, and protein extracts prepared before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 were immunoblotted with anti-HA Ab. (D) MHY501 (WT) and MHY623 (*doa4Δ*) were cotransformed with pHA-Rim8 and Yep96 (+Ub), pCUP1-Ub0K (+Ub0K), or vector control pRS424 (-) and grown in the absence (upper) or presence (lower) of 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> to modulate Ub expression from the *CUP1* promoter. Protein extracts were immunoblotted with anti-HA Ab. (E) Y04414 (*rim8Δ*) was transformed with plasmid pHA-Rim8 or the indicated mutant derivatives, and protein extracts were immunoblotted with anti-HA Ab.

substitution abolishes Rim8 ubiquitination (Fig. 2E, lane 2). As a control, substitution of a second Lys residue in Rim8 box 1, Lys527, had no effect (Fig. 2E, lane 3). Thus, Rim8 is monoubiquitinated at residue K521 within its C terminus.

**Rim8 ubiquitination is dependent on the Rsp5 E3 Ub ligase, which binds a PXY motif in Rim8.** Previous work showed that mammalian  $\beta$ -arrestin-1 interacts with AIP4/Itch, an E3 Ub ligase of the Nedd4 family, to regulate CXCR4 endosomal sorting (5). As Rim8 interacts with a component of the endosome-associated ESCRT machinery, we tested whether Rsp5, the only member of the Nedd4 family in yeast, is involved in Rim8 ubiquitination. Immunoblot analysis of HA-Rim8 shows that Rim8 ubiquitination is undetectable in the *npi* mutant (Fig. 3A), which produces very low levels of Rsp5 (51), suggesting that Rsp5 is responsible for Rim8 ubiquitination.

Rsp5 recognizes a large number of substrates through its WW domains (19). We showed that *in vitro*-synthesized, 35S-labeled Rim8 binds directly to a purified, bacterially expressed fusion of GST and the WW domains of Rsp5 (codons 228 to 430) in pulldown assays (Fig. 3B). Previous studies showed that Rsp5 WW domains bind to PPXY or PXY motifs (11). A PXY motif (PKY; codons 506 to 508), located 12 residues upstream



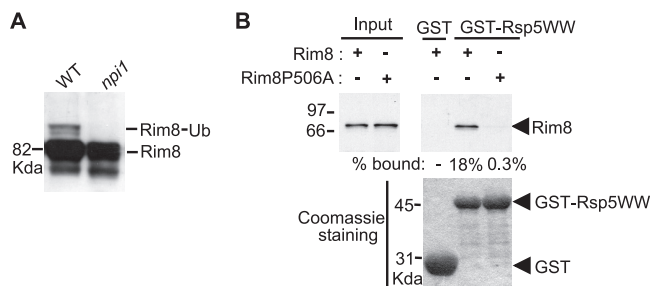


FIG. 3. The Rsp5 Ub ligase is required for Rim8 ubiquitination and binds a PXY motif at the Rim8 C terminus. (A) 23346c (WT) and 27038a (*np1*) were transformed with pHA-Rim8(U), and protein extracts were immunoblotted with anti-HA Ab. (B) *In vitro* binding of Rim8 and Rim8-P506A to Rsp5 WW domains. GST-Rsp5WW or GST was immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with *in vitro*-synthesized [<sup>35</sup>S]Rim8 (the wild type or the P506A mutant). SDS-PAGE gel analysis of pulled down proteins was as described for Fig. 1B.

of the ubiquitinated Lys residue at the C terminus of Rim8 (Fig. 1A), is highly conserved in Rim8 homologs in other *Saccharomyces* species (data not shown). Binding of *in vitro*-synthesized Rim8 to GST-Rsp5WW was almost abolished by a Pro506Ala substitution in the PXY motif (Fig. 3B), suggesting that this motif mediates the direct interaction detected between these two proteins. To assess the physiological role of the PXY-mediated interaction between the Rim8 and Rsp5 WW domains, we tested the effect of the Pro506Ala substitution on Rim8 ubiquitination *in vivo*. Immunoblot analysis of HA-Rim8 shows that Rim8 ubiquitination was markedly reduced upon replacement of the Pro506 residue with Ala (Fig. 2E, lane 4), which is consistent with the idea that the PXY motif in Rim8 mediates a functional interaction with Rsp5 *in vivo*.

**The SXP motif and the monoubiquitinated residue in Rim8 both contribute to binding to Vps23 *in vivo*.** To address the physiological role of the monoubiquitinated residue and the SXP motif in Rim8, we examined the effect on Rim signaling of mutations inactivating one or both of these elements. In agreement with previous work (32, 45, 61), abrogation of Rim signaling in a *rim8Δ* mutant prevents processing of the Rim101 transcription factor (Fig. 4A, lane 3), repression of the Rim101-dependent reporter *CYC1-NRE-lacZ* (Fig. 4B, lane 3), and growth in the presence of lithium (Fig. 4C, lane 3). Truncation of the C terminus of Rim8 (codons 505 to 542), which contains the ubiquitination site and the SXP motif, resulted in a stringent loss of function phenotype *in vivo* (Fig. 4A, B, and C, lanes 2). The ESDP(533-536)/AAAA substitution, which eliminates the SXP motif and abolishes Vps23 binding, also produced a loss-of-function phenotype (Fig. 4A, B, and C, lanes 8), thus indicating that binding of Vps23 to the Rim8 SXP motif plays an essential role in Rim signal transduction. In contrast, the Pro536Leu substitution, which allows some residual binding to Vps23 (see above), or the Lys521Arg substitution, which inactivates the ubiquitination site, had no detectable effect on Rim8 function (Fig. 4A, B, and C, lanes 4 and 5). In agreement with these findings, inactivation of the PXY motif, which mediates the interaction with the Rsp5 Ub ligase, did not impair Rim signaling (data not shown). Strikingly, a

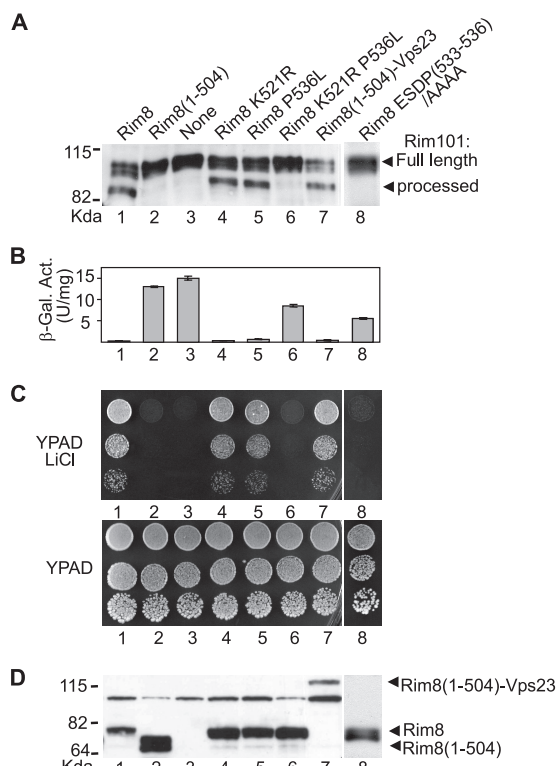


FIG. 4. Effects of Rim8 C-terminal mutations on Rim signaling. (A to C) Functional assays for testing whether plasmids carrying the indicated Flag-tagged *rim8* mutants can complement the *rim8* deletion in the genome. The plasmids used were pFlag-Rim8 (Rim8), vector control pRS313 (none), or the indicated pFlag-Rim8 mutant derivatives. (A) Processing of HA-tagged Rim101 in strain OVY25 (*rim8Δ RIM101-HA*) carrying the indicated pFlag-Rim8 plasmids (top). Protein extracts on an anti-HA immunoblot were analyzed to visualize Rim101-HA. The positions of the full-length and the processed forms of Rim101-HA are indicated. (B) Y04414 (*rim8Δ*) was cotransformed with the plasmid pLGn+3xNRE22D, carrying a *CYC1-NRE-lacZ* reporter, and the indicated pFlag-Rim8 plasmids (top). Values are average β-galactosidase activities for 2 transformants. (C and D) Y04414 (*rim8Δ*) was transformed with the indicated pFlag-Rim8 plasmids (top). (C) Transformants were grown to stationary phase on a minimal medium, and serially diluted samples were spotted on YPAD (upper) or YPAD containing 200 mM LiCl (lower). (D) Protein extracts from the same transformants were analyzed on an anti-Flag immunoblot to visualize Flag-Rim8 and its mutant derivatives.

combination of both Pro536Leu and Lys521Arg substitutions produced a strong loss-of-function phenotype (Fig. 4A, B, and C, lanes 6). Together, these results suggest that partial inactivation of the SXP motif upon replacement of the Pro536 residue with Leu is not sufficient to block Rim signal transduction unless the ubiquitination site is mutated. In light of the fact that the Vps23 UEV domain binds Ub (25), these results are consistent with a contribution of the ubiquitinated residue to the interaction with Vps23 *in vivo*.

To assess the role of Rim8 ubiquitination in Vps23 binding, we used two different approaches. As Rim8 ubiquitination may be a rate-limiting step for the detection of two-hybrid interactions, we first examined whether Ub overexpression restores the two-hybrid binding of Vps23 to Rim8-P536L. Two-hybrid interaction between Vps23 and Rim8-P536L was restored to

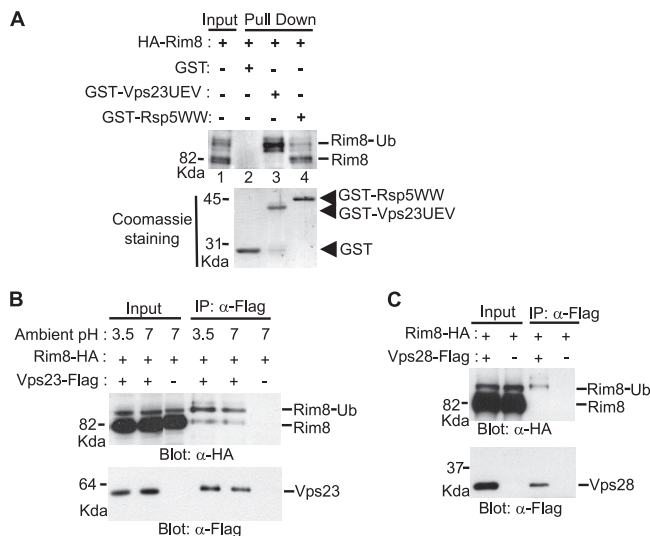


FIG. 5. Interaction of Vps23 and Vps28 with ubiquitinated Rim8. (A) *In vitro* binding of ubiquitinated Rim8 to the Vps23 UEV domain and Rsp5 WW domains. Y04414 (*rim8Δ*) was cotransformed with pHA-Rim8 and Yep96 and grown in the presence of 100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> to overexpress Ub from the *CUP1* promoter in Yep96. Yeast protein extracts were incubated with glutathione-Sepharose beads loaded with GST-Rsp5WW, GST-Vps23UEV, or GST. Pulled down proteins were separated on 10% SDS-PAGE gel and detected by immunoblot analysis with anti-HA Ab (upper) and Coomassie staining (lower). "Input" represents protein extract used for binding experiments (2% of the total reaction mixture). (B) Coimmunoprecipitation of Rim8 and Vps23 from yeast cell extracts. Y04414 (*rim8Δ*) was cotransformed with pRim8-HA and pVps23-Flag (+) or vector control pRS316 (-). Anti-Flag-immunoprecipitated protein extracts (400  $\mu$ g) prepared before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 were immunoblotted with anti-HA (90% of the total precipitates; upper panel) or anti-Flag (10% of the total precipitates; lower panel) Ab. "Input" represents protein extracts used for immunoprecipitation (12  $\mu$ g). (C) Coimmunoprecipitation of Rim8 and Vps28 from yeast cell extracts. Y04414 (*rim8Δ*) and OY121 (*rim8Δ* Vps28-Flag) were transformed with pRim8-HA(U) and grown to mid-log phase (final pH value, 3.5). Anti-Flag-immunoprecipitated protein extracts were analyzed as described above.

about 5% of the wild-type levels upon Ub overexpression, and this effect depends on the integrity of the ubiquitinated K521 residue since no two-hybrid interaction was detected between Rim8-K521R-P536L and Vps23 (Fig. 1D). In contrast to Rim8-P536L, Rim8-ESDP(533-536)/AAAA did not interact with Vps23 when Ub was overexpressed (Fig. 1D), further supporting the idea that the Pro536Leu substitution does not fully inactivate the SXP motif. We then carried out pulldown assays with purified, bacterially expressed GST-Vps23UEV as bait and Rim8 from yeast protein extracts. Ub was overexpressed to improve the detection of ubiquitinated Rim8. In agreement with a role for ubiquitin in Vps23-Rim8 interaction, the Vps23 UEV domain preferentially bound the ubiquitinated form of Rim8 (Fig. 5A, lane 3), although binding to nonubiquitinated Rim8 was also detected under less stringent conditions (data not shown). In contrast, Rim8 ubiquitination did not improve its interaction with Rsp5 WW domains (Fig. 5A, lane 4). Together, these findings indicate that Rim8 ubiquitination contributes to Vps23 binding.

Previous work showed that the translational fusion of the

mammalian Vps23 homolog, Tsg101, to the HIV-1 Gag protein bypasses the requirement for a functional Tsg101-binding Gag PTAP motif in retrovirus budding (34). Then, we tested whether the fusion of Vps23 to C-terminally truncated Rim8 (codons 1 to 504), which lacks both the SXP motif and the ubiquitination site, bypasses the requirement for the C terminus of Rim8 in Rim signaling. Chimeric fusion of Vps23 to Rim8(1-504) fully restored Rim8 function (Fig. 4A, B, and C, compare lanes 2 and 7) and pH-dependent regulation of Rim101 processing (data not shown). The same result was obtained by fusing a truncated form of Vps23, which lacks the UEV domain (data not shown). Thus, the essential role of the Rim8 C terminus, as the HIV-1 Gag PTAP motif, is to recruit the Vps23/Tsg101 UEV domain.

**Rim8 associates with ESCRT-I subunits Vps23 and Vps28 in an ambient pH-independent manner.** To confirm the interaction of Vps23 and Rim8 *in vivo*, we tested whether these proteins coimmunoprecipitate from cell extracts. A *rim8Δ* strain was cotransformed with plasmids expressing functional Rim8-HA and Vps23-Flag from their own promoter on a centromeric vector, and protein extracts were prepared before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 to activate the Rim pathway. Anti-HA immunoblot analysis of Flag-tagged Vps23 immunoprecipitates shows that a fraction of Rim8 coimmunoprecipitated with Flag-Vps23 in an ambient pH-independent manner (Fig. 5B). In agreement with *in vitro* binding assays, Vps23 is preferentially associated with ubiquitinated Rim8 although a small fraction of the nonubiquitinated protein is detected in the precipitates. In control experiments, no Rim8-HA was precipitated by anti-Flag in the absence of Vps23-Flag (Fig. 5B). These results further support the role of Rim8 ubiquitination in Vps23 binding and show that the Rim8-Vps23 interaction is independent of the pH signal. In agreement with these findings, coimmunoprecipitation of Rim8 and Vps23 was also observed in the absence of the putative 7TM pH sensor Rim21 (data not shown). A previous work showed that other components of the ESCRT-I complex are required for Rim signaling (62). We then tested the association of Rim8 with the ESCRT-I subunit Vps28. A *rim8Δ* strain expressing chromosomal Vps28-Flag was transformed with a centromeric plasmid expressing Rim8-HA. Anti-HA immunoblot analysis of Flag-tagged Vps28 immunoprecipitates shows that ubiquitinated Rim8 coimmunoprecipitated with Flag-Vps28 (Fig. 5C). Thus, Rim8 coimmunoprecipitates with both Vps23 and Vps28, strongly suggesting that binding of Rim8 to Vps23 mediates the association of Rim8 with the ESCRT-I complex.

**Rim8 ubiquitination is independent of the activation of the Rim pathway but dependent on binding of Vps23 UEV to the SXP motif.** Ubiquitination of PalF, the Rim8 homolog in *A. nidulans*, is fully dependent on the pH signal and the 7TM protein PalH, partially dependent on the 3TM protein PalI, and independent of the other specific components of the ambient pH signaling pathway (22). In contrast, and consistent with its lack of regulation by ambient pH, Rim8 ubiquitination does not require any specific component of the Rim pathway, including Rim21 and Dfg16, the two yeast homologs of the putative 7TM pH sensor PalH (Fig. 6A, lanes 1 to 7). In addition, Rim8 ubiquitination was also detected in a strain carrying deletions of both *RIM21* and *DFG16* (data not



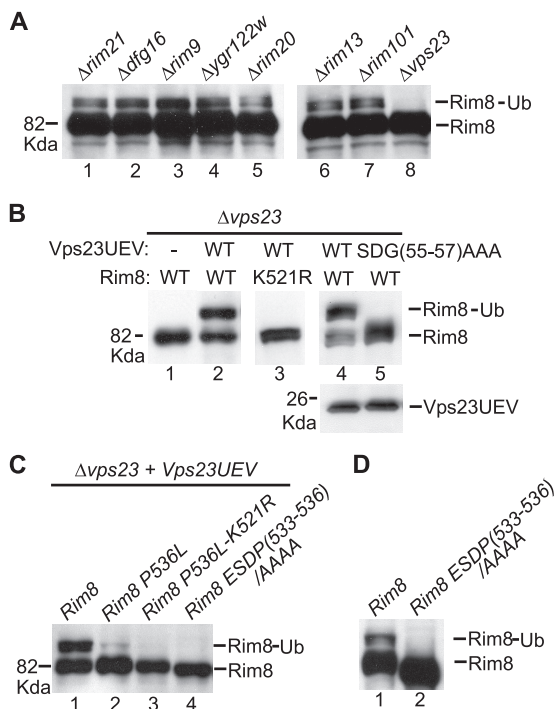


FIG. 6. Rim8 monoubiquitination is dependent on the binding of the Vps23 UEV domain to both Ub and the SXP motif. (A) The indicated mutant strains were transformed with pHA-Rim8, and protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab. (B) Y03416 (*vps23Δ*) was cotransformed with pADH1-HA-Vps23UEV (WT), the indicated mutant derivative [SDG(55-57)AAA] or vector control pWS93 (-), and pHA-Rim8 (WT) or the K521R mutant derivative. Protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab to detect HA-Rim8 (upper) and Vps23UEV-HA (lower, shown only in lanes 4 and 5). (C) Y03416 (*vps23Δ*) was cotransformed with pADH1-HA-Vps23UEV and pHA-Rim8 or the indicated mutant derivatives. Protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab to detect HA-Rim8. (D) Y04414 (*rim8Δ*) was transformed with plasmid pHA-Rim8 or the ESDP(533-536)/AAAA mutant derivative, and protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab.

shown). Unexpectedly, we found that Rim8 ubiquitination is undetectable in a *vps23Δ* mutant strain (Fig. 6A, lane 8). Thus, ubiquitination of Rim8 is independent of the activation of the Rim pathway but strongly dependent on the presence of its binding partner, Vps23. Overexpression of the Vps23 UEV domain is sufficient to restore Rim8 K521 ubiquitination in a *vps23Δ* mutant (Fig. 6B, lanes 2 and 3), although it does not restore Rim signaling (data not shown). Strikingly, the level of monoubiquitinated Rim8 increases up to 50% of the total protein, suggesting that binding of Vps23 UEV to Rim8 promotes the ubiquitination of Rim8. As the UEV domain binds both Ub and the SXP motif, we examined the contribution of each interaction to Rim8 ubiquitination under these conditions. We first generated a Vps23 UEV mutant derivative defective in Ub binding but still able to interact with the Rim8 SXP motif. Structural analysis of the Vps23 UEV domain in a complex with Ub showed that a patch of residues (codons 52 to 57) is specifically involved in Ub recognition (54). In agreement with the structural data, substitution of the last three

residues of this patch to Ala [SDG(55-57)AAA] abolished the Ub-mediated two-hybrid interaction of Vps23 with Rim8 (Fig. 1D) without affecting binding of Vps23 to the Rim8 SXP motif (Fig. 1A). Overexpression of the SDG(55-57)AAA mutant derivative of Vps23 UEV did not restore Rim8 ubiquitination in a *vps23Δ* strain (Fig. 6B, lane 5), thus indicating that Rim8 ubiquitination is strictly dependent on the ability of the UEV domain to bind Ub. Binding of Vps23 UEV to the SXP motif was also required for Rim8 ubiquitination since ubiquitinated Rim8 was undetectable upon inactivation of the SXP motif in Rim8-ESDP(533-536)/AAAA, either in the presence or in the absence of Vps23 UEV overexpression (Fig. 6C, lane 4, and D). In contrast, residual Vps23 UEV-induced ubiquitination of the K521 residue in Rim8-P536L was still detectable (Fig. 6C, compare lanes 2 and 3), which is consistent with the residual Vps23-binding activity of the SXP motif in this mutant. Altogether, these findings indicate that binding of Vps23 UEV to Rim8 promotes its ubiquitination through a mechanism that involves binding of the UEV domain to both Ub and the SXP motif in Rim8.

**Overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures.** Previous studies showed that Vps23 localizes to endosomal compartments and that this localization is lost in the absence of Vps27 (25, 26). As Rim8 appears to substitute Vps27 for recruitment of Vps23, we tested whether overexpression of Rim8 redirects Vps23 to another compartment. Therefore, we examined the localization of RFP-tagged Vps23 either expressed alone or expressed in the presence of GFP-tagged Rim8. Each fusion protein was expressed from its endogenous promoter on a 2 $\mu$ m high-copy-number plasmid. As shown previously (25), and consistent with its endosomal distribution, Vps23-RFP localizes to the cytoplasm and internal punctate structures in the absence of Rim8-GFP (Fig. 7). Cooverexpression with Rim8-GFP, however, resulted in recruitment of Vps23-RFP to cortical punctate structures, where it colocalized with Rim8-GFP (Fig. 7). Notably, some internal Vps23-RFP foci that do not coincide with Rim8-GFP foci were still visible under these conditions (Fig. 7, white arrowhead). Relocalization of Vps23-RFP was not observed when Vps23 was coexpressed with the Rim8-ESDP(533-536)/AAAA mutant protein, which fails to bind to Vps23 (Fig. 7). Under these conditions, as well as in the absence of overexpressed Vps23-RFP, Rim8-GFP localization was diffuse throughout the cytoplasm, with some nuclear enrichment. Together, these results indicate that colocalization of Rim8 and Vps23 in cortical punctate structures is strictly dependent on the interaction between these two proteins.

**DISCUSSION**

Previous genetic studies suggested that a Rim pathway-specific protein substitutes Vps27 for specialized recruitment of the ESCRT machinery. Here, we present evidence that the arrestin-related protein Rim8 mediates the recruitment of the ESCRT-I complex to the 7TM protein Rim21. Rim8 interacts with the C-terminal cytoplasmic tail of Rim21 and, as Vps27, binds directly to the Vps23 subunit of ESCRT-I. Bindings of Vps23 to Vps27 and Rim8 share common features, as they involve the Vps23 UEV domain and related P(S/T)XP and SXP motifs in Vps27 and Rim8,

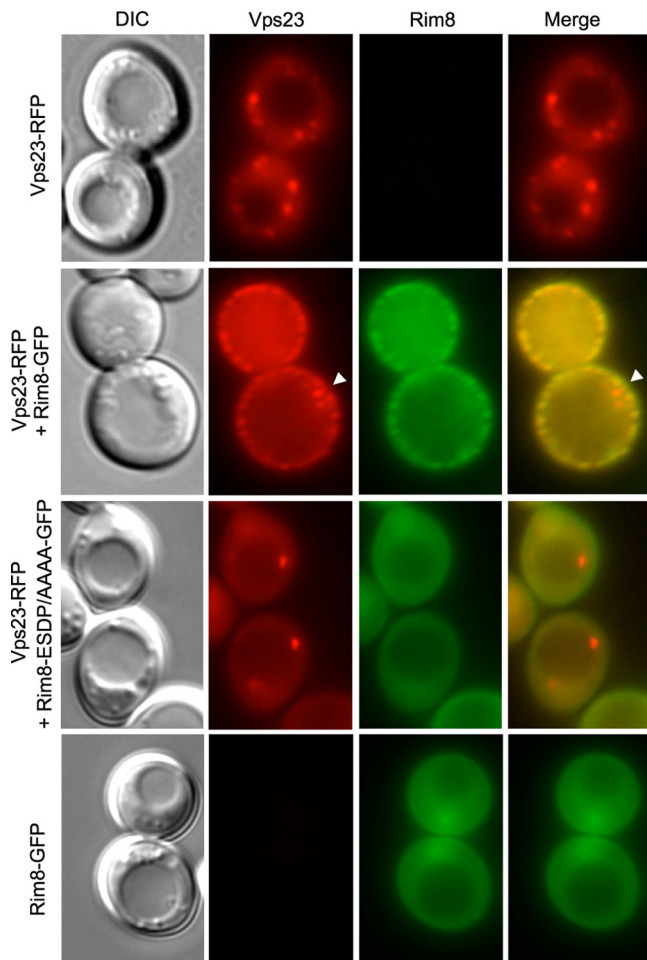


FIG. 7. Overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at the plasma membrane. W303 (WT) was cotransformed with pVps23-RFP or empty vector pRS424 and either pRim8-GFP, the ESDP(533-536)/AAA mutant derivative, or empty vector pRS423, as indicated on the left of the figure. Cells were grown to mid-log phase on synthetic medium, and the subcellular localization of Vps23-RFP and Rim8-GFP was examined by fluorescence and differential interference contrast (DIC) microscopy. The white arrowhead points to internal Vps23-RFP foci that do not coincide with Rim8-GFP foci.

respectively. These findings support a model in which the specific recruitment of the ESCRT machinery to the 7TM protein Rim21 is mediated by Rim8 arrestin domains whereas recruitment to a large number of ubiquitinated cargos for MVB sorting is mediated by Vps27 UIM domains. In agreement with this model, staining with the dye FM4-64 indicates that the *rim8* $\Delta$  mutant does not have an MVB defect (data not shown), which is consistent with previous work showing that Rim signaling components such as Dfg16, Rim21, and Rim101 are not required for MVB pathway function (62).

Both Rim8 and mammalian  $\beta$ -arrestins serve as adaptors linking 7TM proteins to the endocytic machinery. However, whereas  $\beta$ -arrestins bind to clathrin and the clathrin adaptor AP-2, Rim8 interacts with Vps23, a component of the ESCRT machinery. The Vps23-binding site is located at the C terminus of Rim8 in a position similar to that of clathrin and AP-2 binding sites in  $\beta$ -arrestins. Interaction of clathrin with  $\beta$ -ar-

restin-2 is regulated as accessibility of the clathrin binding site increases upon binding of arrestin to the activated 7TM receptor (60). In contrast, the Rim8-Vps23 interaction does not appear to be regulated by the pH signal in coimmunoprecipitation assays. In addition, pH sensing does not require the dissociation of Vps23 from Rim8, as shown by the ability of the Rim8(1-504)-Vps23 chimera to trigger the pH response. These findings support a model in which, in the absence of pH signal transduction, Rim8 is bound to Vps23. Coimmunoprecipitation of Rim8 with both Vps23 and Vps28 suggests that binding of Rim8 to Vps23 mediates the association of Rim8 with ESCRT-I. We hypothesize that, by analogy with the regulation of the receptor-arrestin complex in mammals, binding of Rim8 to the 7TM protein Rim21 mediates the recruitment of the Rim8-bound ESCRT-I complex in response to the pH signal. Vps23 appears to exist exclusively as a component of ESCRT-I (25), and our results indicate that a small fraction of Rim8, which is ubiquitinated, associates with Vps23 and Vps28 in coimmunoprecipitation assays. Ubiquitinated Rim8 is present in a much smaller amount than Vps23 in the cell, suggesting that Rim8 associates with a very small fraction of ESCRT-I. This finding could explain why Rim8 has not been identified as an ESCRT-I associated protein in previous studies.

According to the current model of the Rim pathway, Rim8-mediated endocytic internalization of Rim21 and/or Dfg16 would make the connection between the plasma membrane pH-sensing complex and the endosomal ESCRT-associated Rim101-processing machinery. Our findings that Rim8 binds to both Rim21 and Vps23 would provide the missing link between these two complexes. The hypothetical existence of two spatially segregated complexes in the Rim pathway was proposed on the basis that Rim20 colocalizes with the endosomal marker Snf7-RFP (8). However, it has been shown that C-terminal GFP fusion of Snf7 produces a class E mutant phenotype and accumulates on endosomes (53). Additionally, class E mutations that block ESCRT-III disassembly have been found to bypass the ambient-pH regulatory system, permitting Rim101 processing in the absence of pH-sensing components (20). Thus, we cannot exclude the possibility that location of Rim20 upon Snf7-RFP expression does not represent the Rim20 population that mediates the pH signal under physiological conditions. Then, alternative models, which do not involve spatially segregated complexes, can also be considered. Rim8 appears to associate with ESCRT-I in an ambient pH-independent manner, which is consistent with the idea that binding of Rim8 to the putative ambient pH sensor Rim21 could also mediate recruitment of ESCRTs to the plasma membrane. Such localization of ESCRTs would not be without precedent, since these protein complexes are involved in retroviral budding at the plasma membrane in mammalian cells (36). Additionally, previous studies of *A. nidulans* showed that components of the pH-sensing complex localize to the plasma membrane (9) and that the pH signaling component PalC, which binds ESCRT-III subunit Snf7, is recruited to the plasma membrane in an ambient pH-dependent manner (15). Interestingly, we found that overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures. These structures are not observed when the two proteins fail to interact or when either protein is overexpressed alone. This result, which provides additional evidence of the Rim8-Vps23 interaction, is

consistent with the localization of Rim8-GFP expressed from the *RIM8* genomic locus to peripheral puncta (33). However, these data should be considered with caution since Rim8 overexpression may cause mislocalization of Vps23 to the plasma membrane. Additionally, the fluorescence signal is not representative of ESCRT-I, since Vps23 is overexpressed and the other ESCRT-I subunits are not present stoichiometrically. Thus, further studies will be necessary to determine the location of Rim8-mediated recruitment of the ESCRT machinery.

Our results indicate that the SXP motif in Rim8 is the primary determinant of the interaction with Vps23. Inactivation of the SXP motif in the Rim8-ESDP(533-536)/AAAA mutant abolished Vps23 binding and Rim signaling. In contrast, we found that replacement of the Pro536 residue with Leu does not fully inactivate the SXP motif. Although interaction of Vps23 with Rim8-P536L was not detectable in two-hybrid assays, the residual binding detected between these two proteins in pulldown experiments appears to be sufficient to support Rim8 function *in vivo*. Several lines of evidence support the idea that the SXP motif in Rim8 is related to the previously described P(S/T)XP motif which binds both Vps23 and its mammalian homolog Tsg101 (2, 6, 16, 26). First, both SXP and P(S/T)XP motifs bind to the Vps23/Tsg101 UEV domain. Second, the SXP motif in Rim8 box 1 corresponds to a PSXP motif in the related box 2 sequence found in Rim8 homologs in other fungi. These proteins contain either box 1, box 2, or both, suggesting that SXP and PSXP motifs play the same function. Third, the last Pro residue in the HIV-1 Gag PTAP motif and in the Rim8 SXP motif plays an important role, as its replacement with a Leu residue markedly reduced *in vitro* binding to Tsg101 and Vps23, respectively. In contrast, the replacement of the first Pro residue of the Gag PTAP motif with Ala only moderately reduced Tsg101 binding (16), which is consistent with the ability of its yeast homolog Vps23 to bind both an SDP motif in Rim8 and PSDP motifs in Vps27. It is noteworthy that a recent study showed that the first Pro residue in the feline immunodeficiency virus (FIV) Gag PSAP motif is not required for its function in retrovirus budding (10).

We present genetic and biochemical evidence that a monoubiquitinated Lys residue located 12 residues upstream of the SXP motif contributes to Vps23 binding *in vivo*. Ub overexpression partially restores the two-hybrid interaction between Vps23 and the Rim8-P536L mutant protein, and this effect is dependent on the integrity of the ubiquitinated residue. In addition, pulldown and coimmunoprecipitation assays indicate that Vps23 preferentially binds to the ubiquitinated form of Rim8. In agreement with these results, partial inactivation of the SXP motif upon replacement of the Pro536 residue with Leu is not sufficient to block Rim signal transduction unless the ubiquitination site is mutated. The contribution of these two elements to Vps23 UEV binding is consistent with evidence that the UEV domain of Tsg101 can bind both Ub and the related PTAP motif simultaneously (52). Structural studies indicate that the P(S/T)XP and Ub binding sites in Tsg101 and Vps23 UEV could create a continuous binding surface upon monoubiquitination of a Lys residue upstream of the P(S/T)XP motif (42, 54). This model is supported by our findings and is consistent with the position of the monoubiquitinated residue in Rim8 and with the high level of conservation of the

distance (12 residues) between this residue and the SXP motif in Rim8 homologs.

We further show that Rim8 ubiquitination is dependent on Rsp5, an E3 Ub ligase of the Nedd4 family. Ubiquitinated Rim8 is undetectable in an *npi* mutant, which has very low levels of Rsp5. In addition, a PXY motif located 12 residues upstream of the ubiquitinated residue in Rim8 mediates a direct interaction with Rsp5 WW domains and is required for Rim8 ubiquitination. This result is contrary to previously published data showing that Rim8 from yeast cell extracts, in contrast to other yeast arrestin-related proteins, does not bind Rsp5 WW domains *in vitro* (33). We found that Rim8 is ubiquitinated in a pH-independent manner, suggesting that the interaction with Rsp5 is not regulated by the pH signal. The extraction procedure used in this earlier study may not disrupt the association of Rim8 with endogenous Rsp5, which would prevent the binding of GST-WW to the PXY motif. Thus, our data provide further support to the role of yeast arrestin-related proteins as ubiquitin ligase adaptors (33, 37). Furthermore, our results indicate that the Rsp5-dependent monoubiquitination of Rim8 contributes to the recruitment of the ESCRT machinery. This function of Rim8 may be shared by other yeast arrestin-related proteins (ARTs) that regulate the internalization by endocytosis of specific plasma membrane proteins (33, 37). As mammalian  $\beta$ -arrestin-1 appears to play additional roles in later postinternalization events (5), it is possible that other yeast ARTs mediate the recruitment of the ESCRT machinery for sorting in the MVB pathway.

Our results indicate that binding of Vps23 UEV to Rim8 promotes the ubiquitination of Rim8. Rim8 ubiquitination is undetectable in a *vps23 $\Delta$*  mutant and is restored and even strongly increased upon overexpression of Vps23 UEV. In addition, this effect is dependent on the interaction of the UEV domain with both Ub and the SXP motif. A possible explanation for this unexpected result is that binding of Vps23 to Rim8 occurs in two steps. First, Vps23 would bind to the SXP motif in Rim8 and to Ub linked to the active site of the E3 Ub ligase Rsp5. These two interactions could be required for the correct positioning of Ub and its subsequent linkage to the Rim8 K521 residue. Rim8 ubiquitination would then stabilize the interaction of Rim8 with Vps23. Residual ubiquitination of Rim8-P536L would explain why this mutant protein remains functional unless the K521 residue is mutated. The hypothesis that binding of Ub to Vps23 UEV precedes the linkage of Ub to Rim8 is supported by previous work showing that the Mms2 UEV domain is required for the correct positioning of Ub for linkage-specific polyubiquitin chain formation (13). Although Rim8 ubiquitination appears to contribute to the interaction with Vps23 UEV, it does not play an essential role in Rim signaling. Inactivation of the ubiquitination site does not impair Rim signaling, and we observed only a slight defect in the kinetics of Rim101 processing in response to the pH signal (data not shown). Thus, further studies will be necessary to determine whether Rim8 ubiquitination plays a specific role in the fine-tuning of the Rim pathway.

Strikingly, our findings indicate that the same or related motifs mediate the recruitment of the ESCRT machinery to Pal/Rim proteins in fungi and retroviral Gag proteins in animal cells (Fig. 8). Recruitment of Tsg101, AIP1/Alix, and members of the Nedd4 family of Ub ligases to viral proteins is mediated



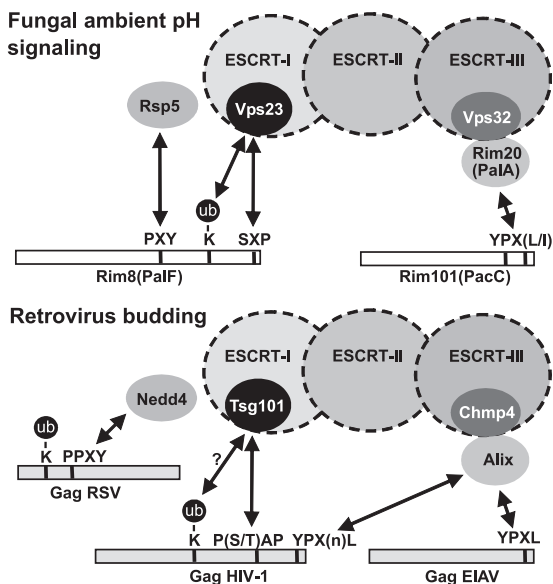


FIG. 8. Conserved interactions of the ESCRT machinery with components of the Pal/Rim signaling pathway and retroviral Gag proteins. A schematic representation (not to scale) of the two components of the Pal/Rim pathway in *S. cerevisiae*, Rim8 and Rim101 (PalF and PacC in *A. nidulans*), and the retroviral Gag proteins of Rous sarcoma virus (RSV), HIV-1, and equine infectious anemia virus (EIAV) shows the positions of the PXY, SXP, and YPX(L/I) motifs in the yeast proteins and the related PPXY, P(S/T)AP, and YPXL motifs in retroviral Gag proteins. Protein monoubiquitination is indicated. The conservation of the ESCRT machinery and associated proteins in fungi and vertebrates is highlighted. Double arrows indicate protein-protein interactions.

by P(S/T)AP, YPXL, and PPXY motifs, respectively (36). Here, we show that SXP and PXY motifs located at the C terminus of Rim8 interact with the Tsg101 and Nedd4 fungal homologs Vps23 and Rsp5, and we previously found that YPX(L/I) motifs in PacC interact with the AIP1/Alix homolog PalA (58). The analogy between Pal/Rim signaling and retrovirus budding is further supported by other evidence. While the translational fusion of Tsg101 to HIV-1 Gag restores retrovirus budding in the absence of a functional Tsg101-binding PTAP motif in the Gag protein (34), fusion of Vps23 to C-terminally truncated Rim8, which lacks the Vps23-binding site, restores Rim8 function and Rim signaling. In addition, it has been suggested that the PTAP-mediated binding of HIV-1 Gag to Tsg101 is stabilized by Gag monoubiquitination (16). We show here that such a molecular mechanism actually occurs in the Rim signaling pathway, where both a monoubiquitinated residue and an SXP motif contribute to the interaction with Vps23 (Fig. 8). Finally, we found that overexpression of Rim8 redirects Vps23 to the plasma membrane in a manner reminiscent of the HIV-1 Gag-dependent relocation of Tsg101 to the plasma membrane of mammalian cells (39). Thus, on the basis of these new findings and our previous identification of the YPXL motif as an AIP1/Alix binding site (58), we believe that the analysis of the Pal/Rim signaling pathway in fungi will provide new clues to the molecular mechanisms involved in retrovirus budding.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jacqueline Segall, Mark Hochstrasser, Linda Hicke, and Francisco Portillo for plasmids and strains.

This work was supported by grants from the Spanish CICYT (BFU2005-01970 and BFU2008-02005), the Comunidad de Madrid and CSIC (CCG07-CSIC/SAL-2145), and Intramural-CSIC (2006 201094). A.H. is recipient of a CSIC-JAE predoctoral fellowship, and S.H. held a Plan de Formación de Personal Investigador studentship.

## REFERENCES

- Babst, M., D. J. Katmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr. 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mbv sorting. *Dev. Cell* 3:271–282.
- Bache, K. G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark. 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* 162:435–442.
- Bartel, P. L., C. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions, p. 153–179. *In* D. A. Hartley (ed.), *Cellular interactions in development: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Barwell, K. J., J. H. Boysen, W. Xu, and A. P. Mitchell. 2005. Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 4:890–899.
- Bhandari, D., J. Trejo, J. L. Benovic, and A. Marchese. 2007. Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 282:36971–36979.
- Bilodeau, P. S., S. C. Winistorfer, W. R. Kearney, A. D. Robertson, and R. C. Piper. 2003. Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J. Cell Biol.* 163:237–243.
- Blanchin-Roland, S., G. Da Costa, and C. Gaillardin. 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 151: 3627–3637.
- Boysen, J. H., and A. P. Mitchell. 2006. Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Mol. Biol. Cell* 17:1344–1353.
- Calcagno-Pizarelli, A. M., S. Negrete-Urtasun, S. H. Denison, J. D. Rudnicka, H. J. Bussink, T. Munera-Huertás, L. Stanton, A. Hervas-Aguilar, E. A. Espeso, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 2007. Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalI assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot. Cell* 6:2365–2375.
- Calistri, A., C. Del Vecchio, C. Salata, M. Celestino, M. Celegato, H. Göttlinger, G. Palù, and C. Parolin. 2009. Role of the feline immunodeficiency virus L-domain in the presence or absence of Gag processing: involvement of ubiquitin and Nedd4-2s ligase in viral egress. *J. Cell. Physiol.* 218:175–182.
- Chang, A., S. Cheang, X. Espanel, and M. Sudol. 2000. Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 275:20562–20571.
- Cornet, M., F. Bidard, P. Schwarz, G. Da Costa, S. Blanchin-Roland, F. Dromer, and C. Gaillardin. 2005. Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 73:7977–7987.
- Eddins, M. J., C. M. Carlile, K. M. Gomez, C. M. Pickart, and C. Wolberger. 2006. Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:915–920.
- Funakoshi, M., and M. Hochstrasser. 2009. Small epitope-linker modules for PCR-based C-terminal tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26: 185–192.
- Galindo, A., A. Hervas-Aguilar, O. Rodriguez-Galan, O. Vincent, H. N. Arst, Jr., J. Tilburn, and M. A. Peñalva. 2007. PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic* 8:1346–1364.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107:55–65.
- Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen, and J. L. Benovic. 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383:447–450.
- Guarente, L. 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101:181–191.
- Gupta, R., B. Kus, C. Fladd, J. Wasmuth, R. Tonikian, S. Sidhu, N. J. Krogan, J. Parkinson, and D. Rotin. 2007. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3:116.

20. Hayashi, M., T. Fukuzawa, H. Sorimachi, and T. Maeda. 2005. Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol. Cell. Biol.* **25**:9478–9490.
21. Hein, C., J. Y. Springael, C. Volland, R. Hagenauer-Tsapis, and B. Andre. 1995. NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* **18**:77–87.
22. Herranz, S., J. M. Rodriguez, H. J. Bussink, J. C. Sanchez-Ferrero, H. N. Arst, Jr., M. A. Peñalva, and O. Vincent. 2005. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:12141–12146.
23. Hochstrasser, M., M. J. Ellison, V. Chau, and A. Varshavsky. 1991. The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:4606–4610.
24. Hurley, J. H. 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**:4–11.
25. Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**:145–155.
26. Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst, and S. D. Emr. 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* **162**:413–423.
27. Kim, J., and J. P. Hirsch. 1998. A nucleolar protein that affects mating efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by altering the morphological response to pheromone. *Genetics* **149**:795–805.
28. Kullas, A. L., M. Li, and D. A. Davis. 2004. Snf7p, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the RIM101 pathway in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **3**:1609–1618.
29. Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron. 2000. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **275**:23120–23126.
30. Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron, and L. S. Barak. 1999. The beta 2-adrenergic receptor/beta arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:3712–3717.
31. Lefkowitz, R. J., and S. K. Shenoy. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**:512–517.
32. Li, W. S., and A. P. Mitchell. 1997. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**:63–73.
33. Lin, C. H., J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan, and S. D. Emr. 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* **135**:714–725.
34. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* **7**:1313–1319.
35. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
36. Morita, E., and W. I. Sundquist. 2004. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:395–425.
37. Nikko, E., J. A. Sullivan, and H. R. Pelham. 2008. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* **9**:1216–1221.
38. Nikko, E., and B. Andre. 2007. Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway. *Traffic* **8**:566–581.
39. Nydegger, S., S. Khurana, D. N. Kremensov, M. Foti, and M. Thali. 2006. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J. Cell Biol.* **173**:795–807.
40. Papa, F. R., and M. Hochstrasser. 1993. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* **366**:313–319.
41. Peñalva, M. A., J. Tilburn, E. Bignell, and H. N. Arst, Jr. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* **16**:291–300.
42. Pornillos, O., S. L. Alam, D. R. Davis, and W. I. Sundquist. 2002. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat. Struct. Biol.* **9**:812–817.
43. Rodriguez-Galan, O., A. Galindo, A. Hervás-Aguilar, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 2009. Physiological Involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J. Biol. Chem.* **284**:4404–4412.
44. Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
45. Rothfels, K., J. C. Tanny, E. Molnar, H. Friesen, C. Commisso, and J. Segall. 2005. Components of the ESCRT pathway, DFG16, and YGR122w are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the DIT1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **25**:6772–6788.
46. Ruden, D. M., J. Ma, Y. Li, K. Wood, and M. Ptashne. 1991. Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**:250–252.
47. Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson, and S. D. Emr. 2009. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* **136**:97–109.
48. Saksena, S., J. Sun, T. Chu, and S. D. Emr. 2007. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* **32**:561–573.
49. Sikorski, R. S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19–27.
50. Song, W., and M. Carlson. 1998. Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *EMBO J.* **17**:5757–5765.
51. Springael, J. Y., and B. Andre. 1998. Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**:1253–1263.
52. Sundquist, W. I., H. L. Schubert, B. N. Kelly, G. C. Hill, J. M. Holton, and C. P. Hill. 2004. Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol. Cell* **13**:783–789.
53. Teis, D., S. Saksena, and S. D. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* **15**:578–589.
54. Teo, H., D. B. Veprintsev, and R. L. Williams. 2004. Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **279**:28689–28696.
55. Terrell, J., S. Shih, R. Dunn, and L. Hicke. 1998. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* **1**:193–202.
56. Tyers, M., G. Tokiwa, R. Nash, and B. Futcher. 1992. The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* **11**:1773–1784.
57. Vincent, O., and M. Carlson. 1999. Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J.* **18**:6672–6681.
58. Vincent, O., L. Rainbow, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 2003. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell. Biol.* **23**:1647–1655.
59. Volland, C., D. Urban-Grimal, G. Geraud, and R. Hagenauer-Tsapis. 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* **269**:9833–9841.
60. Xiao, K., S. K. Shenoy, K. Nobles, and R. J. Lefkowitz. 2004. Activation dependent conformational changes in beta-arrestin 2. *J. Biol. Chem.* **279**:55744–55753.
61. Xu, W., and A. P. Mitchell. 2001. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* **183**:6917–6923.
62. Xu, W., F. J. Smith, Jr., R. Subaran, and A. P. Mitchell. 2004. Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **15**:5528–5537.



## Research Article

# Detection of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport in *Entamoeba histolytica* and Characterization of the EhVps4 Protein

Israel López-Reyes,<sup>1</sup> Guillermina García-Rivera,<sup>1</sup> Cecilia Bañuelos,<sup>1</sup> Silvia Herranz,<sup>2</sup> Olivier Vincent,<sup>2</sup> César López-Camarillo,<sup>3</sup> Laurence A. Marchat,<sup>4</sup> and Esther Orozco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México, CP 07360, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Modelos Experimentales de Enfermedades Humanas, Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Madrid, CP 28029, Spain

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Posgrado en Ciencias Genómicas, México, CP 03100, Mexico

<sup>4</sup>Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN, Programa Institucional de Biomedicina Molecular, México, CP 07320, Mexico

Correspondence should be addressed to Esther Orozco, orozco.esther@gmail.com

Received 23 September 2009; Revised 1 March 2010; Accepted 1 March 2010

Academic Editor: Abhay R. Satoskar

Copyright © 2010 Israel López-Reyes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Eukaryotic endocytosis involves multivesicular bodies formation, which is driven by endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT). Here, we showed the presence and expression of homologous ESCRT genes in *Entamoeba histolytica*. We cloned and expressed the *Ehvps4* gene, an ESCRT member, to obtain the recombinant EhVps4 and generate specific antibodies, which immunodetected EhVps4 in cytoplasm of trophozoites. Bioinformatics and biochemical studies evidenced that rEhVps4 is an ATPase, whose activity depends on the conserved E211 residue. Next, we generated trophozoites overexpressing EhVps4 and mutant EhVps4-E211Q FLAG-tagged proteins. The EhVps4-FLAG was located in cytosol and at plasma membrane, whereas the EhVps4-E211Q-FLAG was detected as abundant cytoplasmic dots in trophozoites. Erythrophagocytosis, cytopathic activity, and hepatic damage in hamsters were not improved in trophozoites overexpressing EhVps4-FLAG. In contrast, EhVps4-E211Q-FLAG protein overexpression impaired these properties. The localization of EhVps4-FLAG around ingested erythrocytes, together with our previous results, strengthens the role for EhVps4 in *E. histolytica* phagocytosis and virulence.

## 1. Introduction

*Entamoeba histolytica* is the enteric protozoan parasite responsible for human amoebiasis that affects 50 million people around the world, causing colitis and liver abscesses [1]. In this organism, phagocytosis and vesicular trafficking play a critical role in ingestion and degradation of host cells and microorganisms. Vacuolar protein sorting (Vps) factors and some proteins that participate in vesicle transport in eukaryotes have been identified in *E. histolytica* [2–4].

In eukaryotic cells, endocytosis consists in phagocytosis, micropinocytosis and pinocytosis. Particularly, phagocytosis involves the ingestion of particles of varying size into

phagosomes, which sequentially fuse with early and late endosomes forming multivesicular bodies (MVB), as well as with lysosomes to form phagolysosomes [5]. Additionally, MVB are critical for cell receptors down-regulation, retroviral budding and other processes [6–8]. MVB formation is driven by the assembly of endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT), which result from the interaction of different class E Vps proteins [9, 10].

The MVB-sorting process initiates with the association of Vps27 and Hse1 proteins to form the ESCRT-0 complex, which is targeted to endosomal membrane domains that bind ubiquitinated cargo proteins (reviewed in [6, 7]). Then, ESCRT-0 recruits ESCRT-I formed by Vps23, Vps28, and



Vps37 proteins, as well as an additional subunit called Mvb12 [11, 12]. Later, ESCRT-II, composed by Vps22, Vps25, and Vps36 proteins, is activated by ESCRT-I [13]. Ubiquitinated cargo proteins are recognized by ESCRT-I via Vps23 and by ESCRT-II via Vps36. Then, ESCRT-III, formed by Vps20, Vps32, Vps2, and Vps24, interacts with ESCRT-II components to complete ESCRT formation [14]. ESCRT-III is required for cargo molecules concentration into MVB vesicles and it coordinates the association of Bro1 protein and Doa4-deubiquitinating enzyme [15–17]. Finally, Vps4 protein catalyzes the ATP-dependent dissociation of ESCRT complexes from endosomes to initiate new rounds of vesicle formation and cargo molecules transport [6, 7]. Particularly, it has been reported that substitution of the conserved E amino acid residue by a Q residue in the Vps4 ATPase motif impairs ATP hydrolysis activity [18, 19], resulting in an inefficient protein transport from endosomal compartments to vacuoles or lysosomes [20–22], which evidenced the critical role of Vps4 in protein transport and vesicle trafficking.

In *E. histolytica*, experimental evidence suggests that MVB-like structures are formed by fusion of inward budding membranes with phagosomes [23]. Ubiquitin, deubiquitinating enzymes and a SNF7 homologue (vesicular trafficking protein) have been identified in isolated phagosomes by proteomic analysis, suggesting that a mechanism similar to MVB formation could be present in *E. histolytica* [23–25]. Additionally, the Bro1 domain-containing EhADH112 protein, which forms part of the *E. histolytica* EhCPADH complex involved in parasite virulence, is located in MVB-like structures in trophozoites [26, 27]. However, molecular mechanisms regulating MVB formation in *E. histolytica* remain poorly understood. Here, by *in silico* analysis from parasite genome databases, we identified 20 ESCRT protein-encoding genes in *E. histolytica* and showed that most of them were transcribed in trophozoites. Since Vps4 has been described as a key molecule to complete the disassembly of ESCRT and associated factors in other systems, we initiated the study of ESCRT machinery in *E. histolytica* by cloning and characterizing the EhVps4 protein. Biochemical assays showed that EhVps4 exhibits ATPase activity *in vitro*. Interestingly, by using trophozoites overexpressing the wild type and a mutant version of EhVps4, we provide data supporting a role for this protein in phagocytosis and virulence.

## 2. Material and Methods

**2.1. In Silico Identification of Putative ESCRT Genes in *E. histolytica*.** Sequence similarity searches for ESCRT genes were performed in *E. histolytica* genome database (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>) by BLAST using human and yeast ESCRT protein sequences as queries. Putative *E. histolytica* ESCRT homologous proteins were selected using the following criteria: (i) at least 20% identity and 35% similarity to the query sequence; (ii) *e*-value lower than 0.002; and (iii) absence of stop codons in the coding sequence. Predicted

amino acids sequences were aligned by ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Functional and structural domains were predicted using PROSITE (<http://www.expasy.org/tools/scanPROSITE/>) and Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) databases. Phylo-genetic relationships among putative ESCRT proteins from *E. histolytica* and other organisms were analyzed using the Neighbor-Joining distance method [28] as implemented in the MEGA package version 3.1 [29]. Phylogenetic trees were generated for each putative *E. histolytica* ESCRT protein aligned with homologues from different species. Robustness of phylogenetic inferences was tested by bootstrapping method, involving 1000 replications of the data based on the criteria of 50% majority-rule consensus.

For 3D modeling of MIT and AAA domains of *E. histolytica* EhVps4, predicted tertiary structures were obtained with the Phyre server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>), using crystal data from yeast Vps4 MIT (2v6xA) and AAA (2qpaB) domains as templates.

**2.2. *E. histolytica* Cultures.** Trophozoites of *E. histolytica* clone A (strain HM1: IMSS) were axenically cultured in TYI-S-33 medium at 37°C and harvested during exponential growth phase [30]. Medium for transfected trophozoites was supplemented with 40 µg/mL G418 (Gibco). Cell viability was monitored by microscopy using Trypan blue dye exclusion test.

**2.3. Semi-Quantitative RT-PCR Assays.** Using Trizol reagent (Invitrogen), total RNA was extracted from 10<sup>6</sup> trophozoites grown in TYI-S-33 medium or 5 minutes after red blood cells (RBC) ingestion. Semiquantitative RT-PCR was performed using 1 µg of DNase I-treated total RNA that was reverse transcribed using Superscript II (Invitrogen) for 2 hours at 42°C. Control samples without Superscript-II were included in all experiments. cDNA samples were subjected to PCR amplification using specific internal primers for distinct *E. histolytica* putative ESCRT genes (see Table T1 in Supplementary material available on line at doi: 10.1155/2010/890674). Briefly, PCR consisted in an initial denaturation step at 94°C for 5 minutes followed by 25 cycles of 35 s at 94°C, 30 s at T<sub>m</sub> calculated for each gene (Supplementary data Table T1), 1 minute 30 s at 72°C and a final extension step at 72°C for 7 minutes. As a control, we amplified a *Eh25S rRNA* gene internal sequence which was used to normalize densitometric data. Products were separated by 1% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized by UV light in a Gel Doc 1000 apparatus (BioRad). Densitometric analysis was performed using the Quantity One software. Three independent experiments were done by duplicate. Statistical significance was determined by *T* Student test [31].

**2.4. Cloning and Sequencing of *EhVps4* and *EhVps4-E211Q* Genes.** The full-length *EhVps4* gene (1260 bp) reported at locus EHI\_118900 in *E. histolytica* Pathema database was PCR amplified from *E. histolytica* genomic DNA using the



*EhVps4*-forward (5'-CCCCGGATCCATGACATCGTTACTTGATAAAGG-3') and *EhVps4*-reverse (5'-CCCCCTCGAGTTATCCATCTTGTCCAAATTGTTC-3') primers in the presence of 0.2 U Pfx DNA polymerase (Invitrogen). Briefly, PCR consisted in an initial denaturation step at 94°C for 5 minutes followed by 28 cycles (30 s at 94°C, 35 s at 55°C, and 1 minute 30 s at 72°C) and a final extension step at 72°C for 7 minutes. The PCR product was cloned into TOPO vector (Invitrogen) yielding the TOPO-*EhVps4* plasmid. Using the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene), we generated a point mutation in the EhVps4 ATPase domain at amino acid 211 to replace glutamic acid (E) by glutamine (Q) to obtain the TOPO *EhVps4*-E211Q plasmid. Both constructions were confirmed by automated DNA sequencing. Then, *EhVps4* and *EhVps4*-E211Q genes were PCR amplified from TOPO plasmids and subcloned in the pGEX-6P1 expression vector (Amersham Biosciences) to generate the recombinant pGEX-6P1-*EhVps4* and pGEX-6P1-*EhVps4*-E211Q plasmids, respectively. Constructions were confirmed by automated DNA sequencing.

**2.5. Expression and Purification of Recombinant EhVps4-GST and EhVps4-E211Q-GST Proteins.** *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) bacteria were transformed with pGEX-6P1-*EhVps4* or pGEX-6P1-*EhVps4*-E211Q plasmids to produce the GST-tagged rEhVps4 and rEhVps4E211Q proteins. Bacteria were grown at 37°C in 2-TY medium containing 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol. rEhVps4-GST expression was induced by 1 mM isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 hours at 37°C. Cells were harvested, resuspended in ice cold PBS buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.3) and lysed by sonication at 4°C in the presence of lysozyme (1 mg/mL). rEhVps4-GST and rEhVps4-E211Q-GST polypeptides were purified near to homogeneity through glutathione affinity chromatography, according to manufacturer recommendations (Amersham Biosciences). To further use the recombinant protein as antigen, the GST tag (25 kDa) was removed from rEhVps4-GST protein by incubation with 2 U PreScission Protease (Amersham Biosciences) during 12 hours at 4°C. Cleaved rEhVps4 protein was dialyzed into PBS pH 7.4. Identity and integrity of purified rEhVps4-GST, rEhVps4-E211Q-GST and rEhVps4 proteins were confirmed by 10% SDS-PAGE and Western blot assays using anti-GST, (GE-Healthcare, 1 : 5000 dilution) and anti-rEhVps4 (1 : 15000 dilution) antibodies, respectively, and the ECL-Plus Western blotting detection system (Amersham Biosciences).

**2.6. Generation of Polyclonal Antibodies against EhVps4.** Purified rEhVps4 without GST tag was submitted to preparative 10% SDS-PAGE and electroeluted from Coomassie stained gels. rEhVps4 (200 µg) in complete Freund's adjuvant (Sigma) was subcutaneously inoculated into a New Zealand male rabbit, and then, three doses of 100 µg rEhVps4 in incomplete Freund's adjuvant were injected at 15 days intervals. Rabbit was bled to obtain polyclonal serum.

**2.7. ATPase Activity Assay.** The ATPase activity assay procedure was based on that previously described [32] using the PiPer Phosphate Assay kit (Invitrogen), with minimal modifications. Briefly, Amplex red was diluted in DMSO to a 10 mM final concentration. Maltose phosphorylase, maltose, glucose oxidase, and horseradish peroxidase were diluted in enzyme buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5) to a final concentration of 200 U/mL, 40 mM, 200 U/mL, and 100 U/mL, respectively. Assay buffer (100 mM Tris, 20 mM KCl, and 6 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) was added to a 96-well plate. The volume corresponding to 3.5 µg and 5 µg of purified and dialyzed rEhVps4-GST, rEhVps4-E211Q-GST, and rGST proteins was added to wells and enzyme buffer was added up to 27 µL. 50 µL of working solution (2 U/mL glucose oxidase, 4 U/mL maltose phosphorylase, 0.4 mM maltose, 100 µM amplex red, 0.4 U/mL HRP) were added to wells. Controls consisting in enzyme buffer or enzyme buffer with working solution were included. Fresh ATP was diluted in assay buffer to a concentration of 2.5 mM and added to each well to a final volume of 100 µL. Plates were mixed by pipetting and shaken for 30 s to ensure homogeneity. Then, reactions were kept at 25°C for 30 minutes and protected from the light. The absorbance was measured at 562 nm at 30 minutes and data were documented. The purified rGST protein was used as negative control in ATPase assays. Assays were performed twice by triplicate.

**2.8. Plasmids Construction for Transfection Assays.** The mutant *EhVps4*-E211Q gene and the wild type *EhVps4* gene were PCR amplified from TOPO *EhVps4*-E211Q and TOPO-*EhVps4*, respectively, using the *EhVps4*-S-*KpnI* (5'-CCCCGGTACCATGACATCGTTACTTGATAAAGG-3') and *EhVps4*-AS-FLAG-*BamHI* (5'-CCCCGGATCCTTACTTATCGTTCGTCATCCTTGTAATCTCCATCTTGTCCAAATTGTTC-3') primers and cloned into pNEO vector for further transfection assays [33]. The underlined nucleotide sequence corresponds to the FLAG epitope (1 kDa) [34] that was added to the carboxy terminus of recombinant proteins to allow their specific immunodetection in transfected trophozoites. The resulting plasmids named p*EhVps4*-E211Q and p*EhVps4* were confirmed by automated DNA sequencing.

**2.9. In Vitro and In Vivo Virulence of Transfected Cells.** Trophozoites were transfected with 200 µg of p*EhVps4*-E211Q, p*EhVps4* and control pNEO plasmids by electroporation as described [33]. Briefly, amoebae (10<sup>7</sup>) were washed twice in cold PBS and once in cold complete cytomix buffer. Electroporation was performed with the Bio-Rad Gene Pulser using 1200 V/cm and 25 µF, with a constant time of 0.4 ms. Electroporated cells were transferred into fresh culture medium for 48 hours before selecting them with 10 µg/mL G418.

In vitro virulence of nontransfected and transfected trophozoites (10<sup>5</sup>) was measured on MDCK cells (6 × 10<sup>4</sup>) as described [35, 36]. Rate of erythrophagocytosis was evaluated using trophozoites and RBC in a 1 : 100 relation, at 5, 10, and 15 minutes [37].

In vivo virulence of transfected trophozoites was evaluated as described [38]. Briefly, under sterile conditions and intraperitoneal anaesthesia with 0.2 mg Anesthal (Pfizer), three groups of six hamsters each were laparotomized and intraperitoneally challenged with p*EhVps4*-E211Q, p*EhVps4*, or p*NEO* transfected trophozoites ( $2.5 \times 10^6$ ) in a volume of 0.1 mL PBS using a 29-gauge needle. Seven days after challenge, animals were anaesthetized and livers were removed to evaluate hepatic damage.

**2.10. Immunodetection of *EhVps4* in Trophozoites.** Western blot assays were performed using 30  $\mu$ g of total proteins from nontransfected or p*NEO*, p*EhVps4*, and p*EhVps4*-E211Q transfected trophozoites. We used anti-FLAG monoclonal (1 : 700) or anti-r*EhVps4* polyclonal (1 : 15000) antibodies and rabbit anti-mouse and goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Zymed; 1 : 10000), respectively. Immunodetected proteins were revealed with the ECL Plus Western blotting system (Amersham Biosciences). As an internal control, we used monoclonal antibodies raised against *E. histolytica* actin (1 : 1000) and goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Zymed; 1 : 10000).

For confocal microscopy assays, nontransfected and transfected trophozoites were grown on coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde at 37°C for 1 hour, permeabilized with Triton X-100 and blocked with 1% bovine serum albumin in PBS. Then, nontransfected and transfected cells were incubated with polyclonal anti-r*EhVps4* (1 : 5000) or monoclonal anti-FLAG primary antibodies (Sigma; 1 : 500), respectively, at 37°C for 2 hours, followed by incubation with anti-rabbit or anti-mouse fluoresceinated (Zymed; 1 : 100) monoclonal antibodies, at 37°C for 1 hour. Next, trophozoites were washed three times with PBS 1X at room temperature and DNA was counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (5  $\mu$ g/mL) for 5 minutes. To immunolocalize *EhVps4* during erythrophagocytosis, p*EhVps4* transfected cells were incubated with RBC (1 : 20) for 10 minutes. Ingested RBC were stained with diaminobenzidine (0.84 mM 3,3'-diaminobenzidine, 0.048% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 50 mM Tris-HCl, pH 9.5) for 5 minutes and cells were incubated with polyclonal anti-r*EhVps4* (1 : 5000) to be processed for immunofluorescence as described above. Light optical sections (1.5  $\mu$ m) were obtained through a Leica inverted microscope attached to a laser confocal scanning system TCS-SP2 (Leica).

### 3. Results

**3.1. *E. histolytica* Genome Contains Homologous ESCRT Genes That Are Expressed in Trophozoites.** To investigate the presence of ESCRT-related genes in *E. histolytica*, we surveyed the parasite genome sequence at Pathema database using the amino acid sequences of yeast and human ESCRT proteins as queries. We detected a set of 20 putative ESCRT protein-encoding genes, which exhibited significant *e*-values ( $1.1e - 114$  to 0.00032) and high similarity (20 to 62%) to yeast and human ESCRT (ESCRT 0-III and associated factors) orthologues (see Table 1). However, we

did not find homologues for yeast Mvb12, and Bullp protein involved in protein ubiquitination, neither human Vps37-B and Vps37-C proteins. Phylogenetic inference revealed that *E. histolytica* ESCRT predicted proteins are closely related to homologous proteins from other protozoa, such as *Giardia lamblia*, *Tetrahymena thermophila*, *Trichomonas vaginalis*, *Plasmodium vivax*, *Cryptosporidium homini*, and *Trypanosoma cruzi* (data not shown). Bioinformatics analysis showed that *E. histolytica* ESCRT predicted proteins have the most characteristic functional domains (see Supplementary data Figure S1) and tertiary structure folding described for yeast and human ESCRT factors (data not shown).

To determine whether the putative *E. histolytica* ESCRT genes were expressed, we performed RT-PCR assays for the 16 most conserved genes. In basal culture conditions, 15 genes were transcribed, but the *EhVps22* transcript was not detected in these experiments (see Figures 1(a) and 1(b)). We also performed RT-PCR assays using RNA obtained from trophozoites incubated with RBC for 5 minutes to investigate whether erythrophagocytosis has an effect on ESCRT gene expression (see Figures 1(a) and 1(b)). In these assays, we found that all genes were expressed during erythrophagocytosis at similar levels as in basal conditions. Again, we did not detect the *EhVps22* gene expression. Interestingly, *EhVps23* and *Ehadh112* were 2- and 3-fold up-regulated, respectively. By densitometric analysis, the band given by the amplified *Eh25S rRNA* product in both conditions was taken as 100% and used to normalize ESCRT genes data.

**3.2. The Predicted *EhVps4* Protein Conserves the Typical Architecture of *Vps4* Homologues.** Since *Vps4* orthologues have been described as key molecules for the dissociation of ESCRT, we first focused on the characterization of the *E. histolytica* *EhVps4* protein. The predicted *EhVps4* contains the N-terminal MIT (microtubule interacting and transport), AAA (ATPase associated with a variety of activities) and *Vps4* C-terminal domains (see Figure 2(a)) that are characteristic and essential for *Vps4* proteins biological functions [39, 40]. Phylogenetic trees revealed that *EhVps4* is more related to protozoan *Vps4* than orthologous proteins from higher eukaryotes (see Figure 2(b)). Interestingly, 3D modeling of *EhVps4*, using the crystal structure of MIT and AAA domains from yeast *Vps4p* and human *Vps4B* as templates (see Figure 2(c)), showed that *EhVps4* region spanning the N-terminal MIT and AAA ATPase domains exhibited a similar folding with the conserved *Vps4*  $\alpha$ -helices.

**3.3. Expression and Immunodetection of *EhVps4* Protein in Trophozoites.** We produced and purified the recombinant *EhVps4* protein as a GST-tagged fusion polypeptide (r*EhVps4*-GST) in *E. coli* (see Figure 3(a), lanes 3, 4). By Western blot assays using commercial anti-GST monoclonal antibodies, we immunodetected the purified r*EhVps4*-GST as a 72 kDa protein in IPTG-induced bacteria (see Figure 3(b), lane 2) but not in protein extracts from noninduced bacteria (see Figure 3(b), lane 1). The r*EhVps4*-GST was digested with the PreScission Protease to obtain the r*EhVps4*

TABLE 1: Comparison of *Entamoeba histolytica*, *Homo sapiens*, and *Saccharomyces cerevisiae* ESCRT machineries.

Putative complex	Predicted protein	<i>Entamoeba histolytica</i>					<i>Homo sapiens</i>					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
		Accession number <sup>a</sup>	Protein	Accession number <sup>b</sup>	e-value	S (%)	I (%)	Protein	Accession number <sup>a</sup>	e-value	S (%)	I (%)	Protein	Accession number <sup>a</sup>	e-value	S (%)	I (%)	
ESCRT-0 complex	EhHse1	EHL_091530	STAM1	Q92783	9e-08	72	50	Hse1p	P38753	2e-10	70	62						
	EhVps27	EHL_117910	HRS	O14964	—	—	—	Vps27p	P40343	1e-11	61	49						
	EhVps23	EHL_135460	TSG101	Q99816	1.4e-10	51	33	Vps23p	P25604	0.0052	31	25						
ESCRT-I complex	EhVps28	EHL_108630	hVps28	Q9UK41	—	—	—	Vps28p	Q02767	0.00057	45	28						
	EhVps37A	EHL_077870	hVps37A	Q6NWX7	0.00022	55	24	Vps37p	Q99176	0.00084	46	21						
	EhVps37D	EHL_060400	hVps37D	Q6P2C3	3.8e-06	50	35	nd	—	—	—	—						
	nd	—	nd	—	—	—	—	Mvb12	P42939	—	—	—						
ESCRT-II complex	EhVps22	EHL_131120	EAP30	Q96H20	9e-22	47	30	Vps22p	Q12483	3.4e-15	48	25						
	EhVps25	EHL_137860	EAP20	Q9BRG1	9e-08	52	28	Vps25p	P47142	0.00038	46	19						
	EhVps36	EHL_045320	EAP45	Q86VN1	1.8e-15	49	25	Vps36p	Q06696	1.1e-09	48	26						
ESCRT-III complex	EhVps2	EHL_194400	CHMP2A	O43633	8.9e-24	55	29	Vps2p	P36108	2e-05	50	29						
	EhVps20	EHL_066730	CHMP2B	Q9UQN3	7.9e-16	48	25	—	—	—	—	—						
	EhVps24	EHL_048690	CHMP6	Q96FZ7	—	—	—	Vps20p	Q04272	0.00015	54	26						
	EhVps32	EHL_169820	CHMP3	Q9Y3E7	—	—	—	Vps24p	P36095	2.2e-05	48	22						
		—	—	CHMP4A	Q9BY43	0.0012	48	24	Vps32p	P39929	2.5e-12	48	25					
Vps4	EhVps4	EHL_118900	CHMP4B	Q9H444	9.6e-07	43	20	nd	—	—	—	—						
	—	—	CHMP4C	Q96CF2	1.4e-06	43	20	nd	—	—	—	—						
	—	—	hVps4A	Q9UN37	1.1e-114	69	52	Vps4p	P52917	3e-114	78	60						
Other MVB proteins	EhVta1	EHL_010040	hVta1	Q9NP79	2.8e-05	44	23	Vta1p	Q06263	—	—	—						
	EhVps46	EHL_093850	CHMPIA	Q9HD42	—	—	—	Vps46p	P69771	0.00032	48	18						
		—	—	CHMP1B	Q7LBR1	—	—	nd	—	—	—	—						
	EhVps60	EHL_114790	CHMP5	Q9NZZ3	5.6e-15	45	28	Vps60p	Q03390	9e-06	46	19						
	EhDoa4	EHL_012290	UBP4	Q13107	1e-77	58	36	Doa4p	P32571	2e-27	50	31						
EhADH112	EHL_181220	ALIX	Q9UKL5	1e-21	40	20	Rim20p	Q12033	2e-12	38	21							
Ubiquitination components	nd	—	nd	—	—	—	BRO1p	P48582	0.003	50	32							
	EhRsp5	EHL_011530	NEED4	P46934	1.6e-50	53	33	Bullp	P48524	—	—	—						
							Rsp5p	P39940	7.8e-57	57	36							

<sup>a</sup>Pathema Entamoeba Bioinformatics Resource Center. <sup>b</sup>Swiss-Prot/TrEMBL databases. nd: not determined. —: Denote nonsignificant similarity/identity and e-values. S: Similarity. I: Identity.

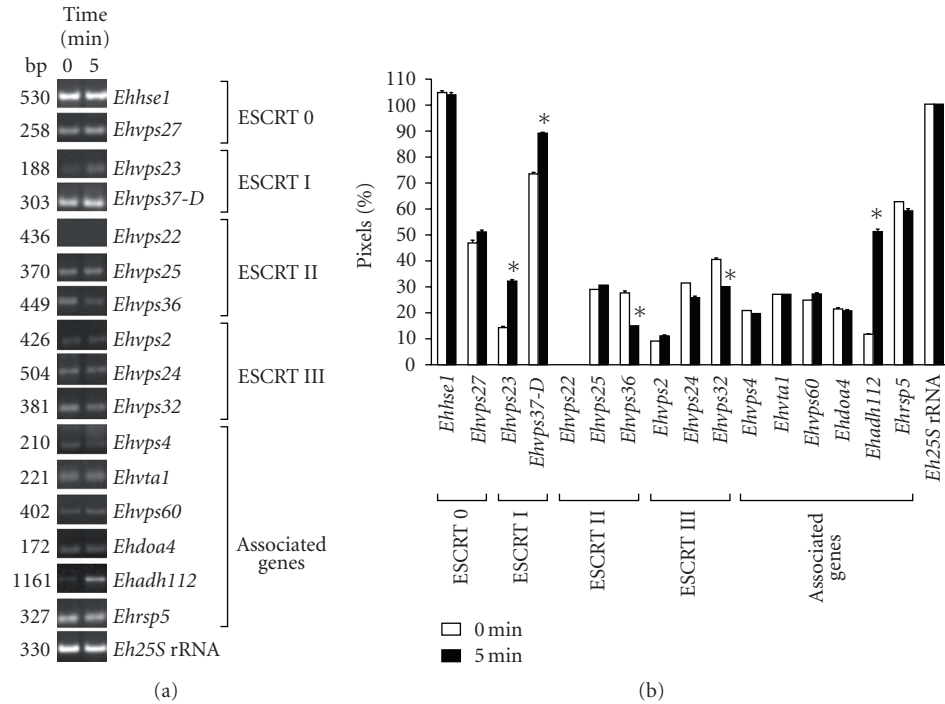


FIGURE 1: mRNA expression profile of *E. histolytica* putative ESCRT machinery genes. (a) RT-PCR products obtained from 1  $\mu$ g of total RNA from trophozoites growing in TYI-S-33 medium (0 minute) or after 5 minutes of erythrophagocytosis. (b) Densitometric analysis of RT-PCR products in (a). Pixels corresponding to *Eh25S rRNA* amplified product were taken as 100% in each lane. Data represent the mean of three independent experiments performed by duplicate for each gene. Asterisk, genes whose transcription is significantly changed according to *T* Student test.

untagged protein (47 kDa) (see Figure 3(c), lanes 2 and 3), which was also purified (see Figure 3(c), lane 4) and used to generate rabbit polyclonal antibodies. Anti-rEhVps4 serum recognized the untagged rEhVps4 protein, confirming the antibodies specificity (see Figure 3(d)). In addition, the same antibodies detected a single 47 kDa band in *E. histolytica* protein extracts (see Figure 3(e), lane 1), which corresponds to the expected molecular weight for the predicted EhVps4 polypeptide amino acid sequence. Antibodies did not detect any other AAA ATPases predicted in the *E. histolytica* genome [41]. Pre-immune serum, used as a control, did not recognize any band in trophozoite extracts (see Figure 3(e), lane 2). Through immunofluorescence and laser confocal microscopy assays, the specific rabbit polyclonal antibodies revealed EhVps4 as abundant small dots dispersed in the cytosol (see Figure 3(f)).

**3.4. ATPase Activity Assays.** To investigate whether the recombinant protein exhibited ATPase activity we used the rEhVps4 purified protein and a mutant version (EhVps4-E211Q) in which we changed the E211 residue of the AAA motif, essential for enzyme activity, by a Q residue (see Figure 4(a)) [18, 42]. Reactions were carried out using the PiPer Phosphate Assay Kit (Invitrogen) in the presence of 500  $\mu$ M ATP. Inorganic phosphate (Pi) release was measured spectrophotometrically at  $A_{562}$ . At zero time, absorbance values of samples containing rEhVps4-GST, rEhVps4-E211Q-GST and control rGST purified proteins (see Figure 4(b)) were

similar and they were taken as background. At 30 minutes,  $A_{562}$  values increased to  $0.115 \pm 0.008$  and  $0.162 \pm 0.022$ , using 3.5  $\mu$ g and 5  $\mu$ g of rEhVps4-GST protein, respectively. No significant  $A_{562}$  increase was detected when we used rEhVps4-E211Q-GST or rGST proteins at 30 minutes (see Figure 4(c)). These results showed that rEhVps4-GST has ATPase activity and that the AAA motif is essential for ATP hydrolysis.

**3.5. Generation of Trophozoites Overexpressing the EhVps4-FLAG and Mutant EhVps4-E211Q-FLAG Proteins.** To investigate the role of EhVps4 in *E. histolytica*, we generated transfectant trophozoites that overexpress the EhVps4 and the mutant EhVps4-E211Q FLAG-tagged proteins (see Figure 5(a)). Trophozoites transfected with pNEO vector were used as control in these experiments. Viability of transfected trophozoites was up to 90% as determined by trypan blue exclusion assays.

RT-PCR assays, using specific primers for *Ehvps4* gene, showed that trophozoites transfected with pEhVps4 or pEhVps4-E211Q plasmids expressed a higher amount of the *Ehvps4* transcript in comparison to pNEO transfected cells (see Figure 5(b), upper panel, lanes 1, 2, and 3). As control, we amplified the *Eh25S rRNA* transcript, which showed minimal changes among the different transfectants studied (see Figure 5(b), lower panel).

By Western blot assays, using the anti-FLAG antibodies, we detected the EhVps4-FLAG and EhVps4-E211Q-FLAG



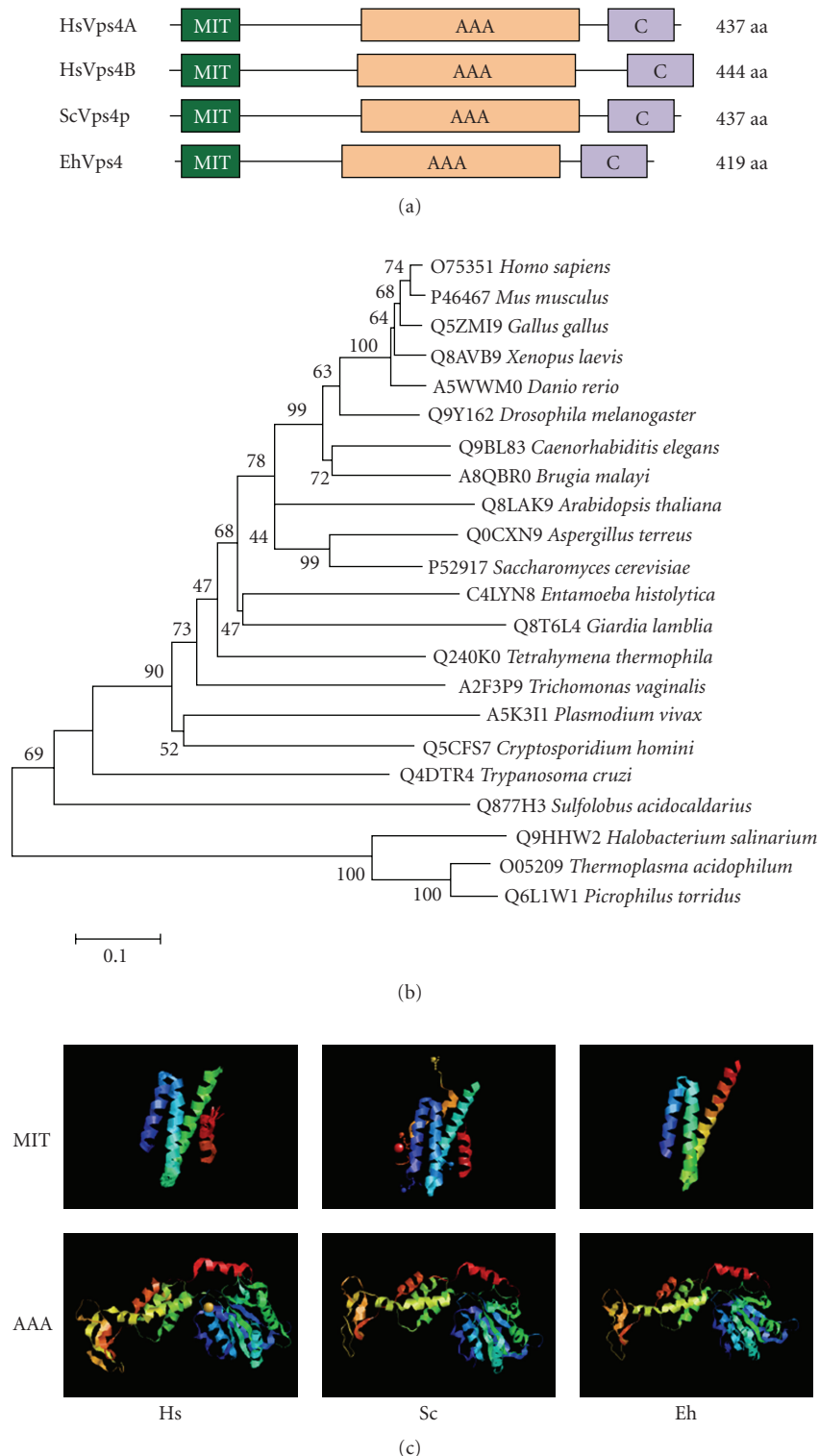
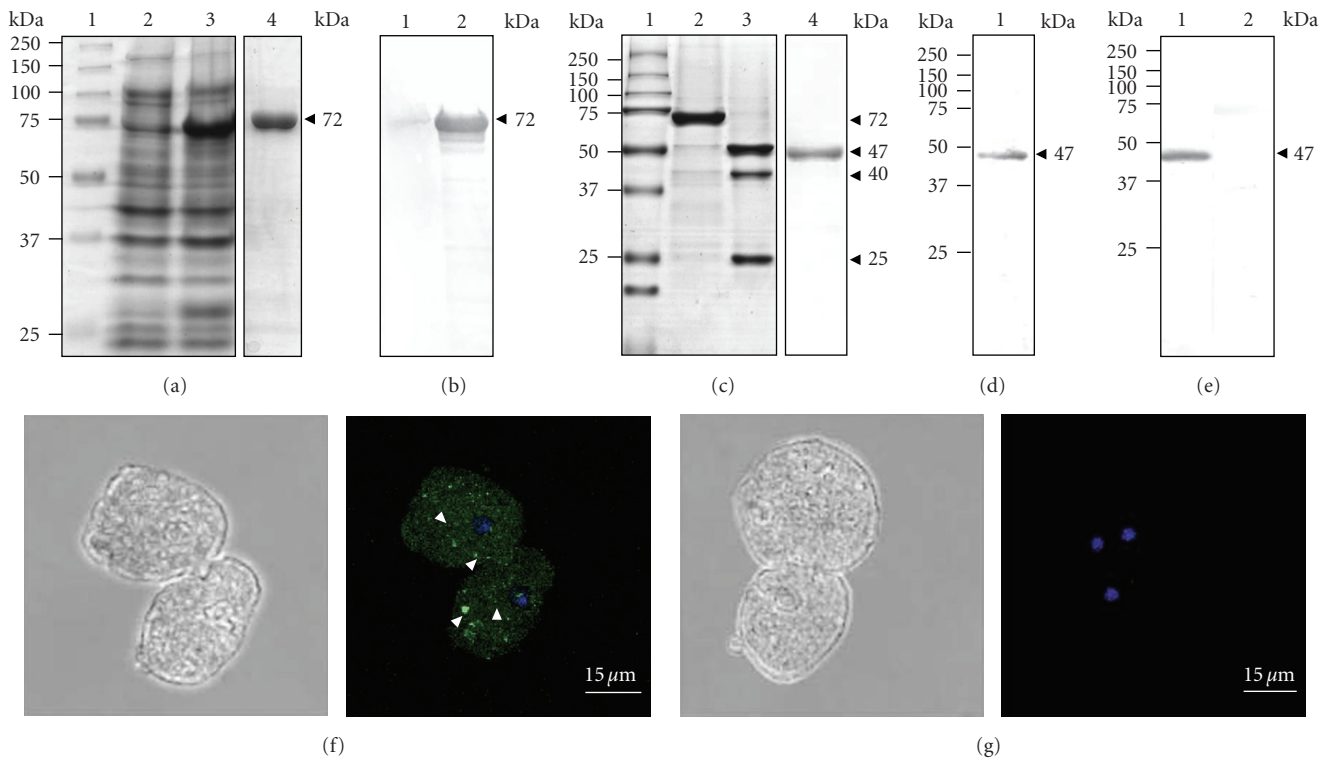


FIGURE 2: Comparison of EhVps4 with other Vps4 proteins. (a) Schematic representation of Vps4 proteins from human, yeast and *E. histolytica*. Conserved MIT, AAA, and Vps4 C-terminal (C) domains were predicted using PROSITE and Pfam programs. (b) Phylogenetic relationships between EhVps4 and homologous proteins from other organisms. The phylogenetic tree of Vps4 homologues was created with the MEGA 3.1 program using the Neighbor Joining algorithm based on ClustalW alignments of complete amino acids sequences. Numbers on tree nodes represent the bootstrap proportions (%) of 1000 replications. The UniProt KnowledgeBase database accession number for each protein is indicated before the organism. (c) Comparison of 3D structures of MIT and AAA domains from human (*Hs*), yeast (*Sc*) and *E. histolytica* (*Eh*) Vps4 homologues. 3D modeling of EhVps4 MIT and AAA domains was obtained using crystal data from yeast Vps4p MIT (2v6xA) and AAA (2qpAB) domains as template, respectively.



**FIGURE 3:** Expression and immunodetection of EhVps4. (a) Expression and purification of recombinant EhVps4-GST polypeptide. Proteins were separated through 10% SDS-PAGE and gels were stained with Coomassie blue. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, noninduced bacteria extract; lane 3, IPTG-induced bacteria extract; lane 4, affinity purified rEhVps4-GST from IPTG-induced bacteria extract. (b) Immunodetection of rEhVps4-GST. Western blot assays were performed using noninduced bacteria extract (lane 1) and IPTG-induced bacteria extract (lane 2), with anti-GST antibodies. (c) PreScission Protease digestion of rEhVps4-GST revealed by Coomassie blue stained gels. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, purified rEhVps4-GST protein; lane 3, rEhVps4-GST digested with PreScission Protease; lane 4, purified rEhVps4 protein. (d) Immunodetection of purified rEhVps4 protein by Western blot assays using specific anti-rEhVps4 antibodies (lane 1). (e) Immunodetection of EhVps4 in total extracts of trophozoites using specific anti-rEhVps4 antibodies (lane 1) and preimmune serum (lane 2). Proteins are indicated by arrowheads. (f) and (g) Cellular localization of EhVps4 in trophozoites. Trophozoites of clone A were incubated with rabbit anti-rEhVps4 (f) or preimmune (g) serum, treated with FITC-labeled secondary antibodies, counterstained with DAPI and analyzed through confocal laser microscopy. Left, cells observed in phase contrast; right, merge (trophozoites observed in the green (FITC) and blue (DAPI) channels). Arrowheads, EhVps4 signal in small cytoplasmic dots.

proteins in p*EhVps4* and p*EhVps4*-E211Q transfectant cells, whereas no signal was detected in p*NEO* transfectants, as expected (see Figure 5(c), upper panel). However, specific anti-rEhVps4 antibodies recognized endogenous EhVps4 protein in p*NEO* transfectants (see Figure 5(c), middle panel, lane 1), meanwhile signal increased 2.8- and 9.2-fold in p*EhVps4* and p*EhVps4*-E211Q transfectant cells, respectively (see Figure 5(c), middle panel, lanes 2, and 3). Anti-actin antibodies detected similar amounts of protein in the different transfectants (see Figure 5(c), lower panel). For densitometric analysis, actin band was taken as 100% in each lane and used to normalize EhVps4, EhVps4-FLAG, and EhVps4-E211Q-FLAG data (see Figure 5(d)).

**3.6. Cellular Localization of EhVps4-FLAG and EhVps4-E211Q-FLAG Proteins in Transfected Trophozoites.** To investigate the cellular localization of exogenous wild type EhVps4 and mutant EhVps4-E211Q FLAG-tagged proteins in transfected trophozoites, we performed immunofluorescence assays using anti-FLAG antibodies (see Figure 6).

In p*EhVps4* transfected trophozoites, anti-FLAG antibodies detected the overexpressed exogenous protein diffuse in the cytoplasm and at the plasma membrane (see Figure 6(d)). In contrast, in mutant p*EhVps4*-E211Q transfected cells, signal was not observed at the plasma membrane, but it was present as cytoplasmic structures of varying sizes (see Figure 6(f)). As expected, no signal was detected by anti-FLAG antibodies in p*NEO* transfected cells (see Figure 6(b)). Control assays without anti-FLAG primary antibodies did not show any signal in transfected trophozoites (see Figure 6(h)).

**3.7. Cytopathic Activity, Erythrophagocytosis and Liver Abscesses Formation Are Impaired in Trophozoites Overexpressing the Mutant EhVps4-E211Q-FLAG Protein.** To initiate the phenotypical characterization of trophozoites transfected with p*EhVps4* or p*EhVps4*-E211Q constructs, we first evaluated their cytopathic activity and rate of erythrophagocytosis. Nontransfected clone A and p*NEO* transfected cells were used as controls in these experiments. After 1 hour interaction of MDCK cells with trophozoites

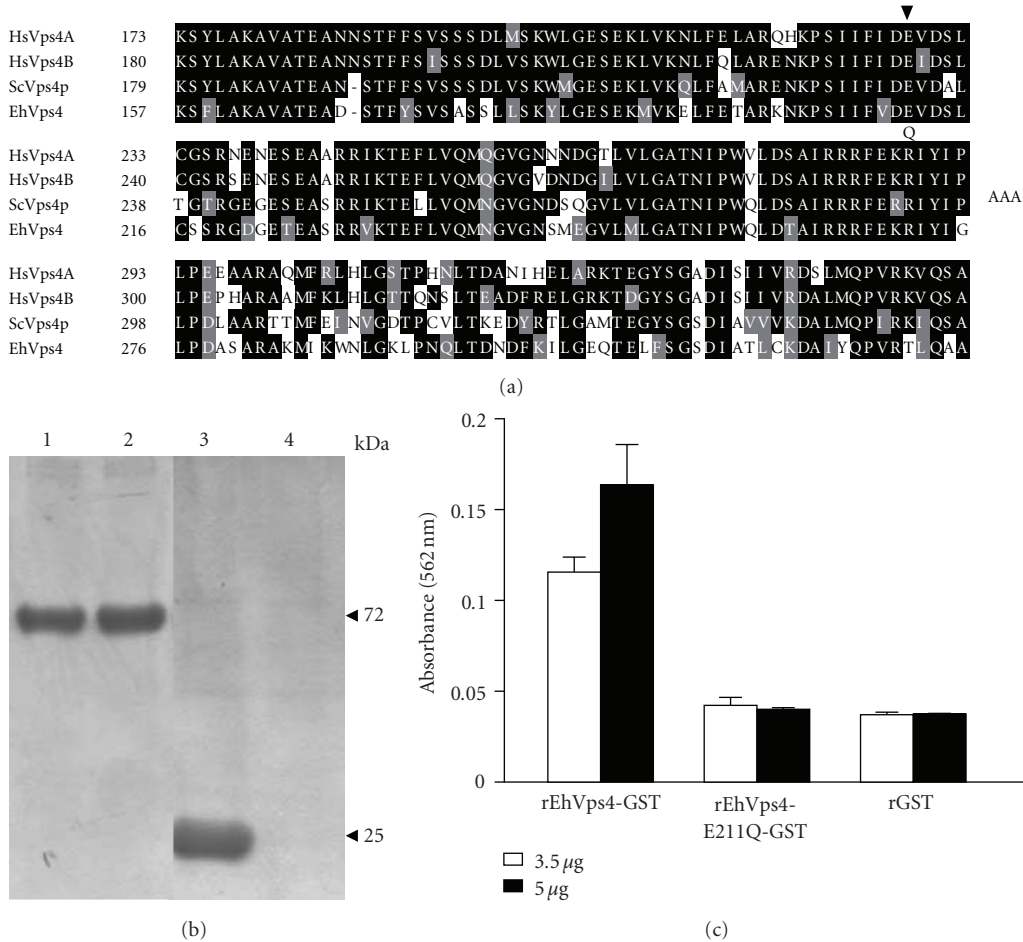


FIGURE 4: Measurement of ATPase activity of recombinant EhVps4. (a) Multiple sequence alignment of Vps4 AAA domain from *Homo sapiens* (HsVps4A and HsVps4B), *S. cerevisiae* (ScVps4p) and *E. histolytica* (EhVps4). Black boxes, identical amino acid (aa); grey boxes, conserved substitutions; open boxes, different aa. Numbers at the left are relative to the position of the initial methionine in each protein. Arrowhead indicates the position of the conserved E residue. (b) Purification of recombinant proteins. Proteins were expressed in *E. coli*, purified through affinity chromatography, separated through 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Lane 1, rEhVps4-GST; lane 2, rEhVps4-E211Q-GST; lane 3, rGST; lane 4, purified fraction from noninduced bacteria extract. (c) ATPase assay. ATPase activity of rEhVps4-GST and rEhVps4-E211Q-GST was monitored as described in Section 2.7. rGST was included as control. Data are the mean of three independent assays.

of clone A, pNEO or pEhVps4 transfected trophozoites, monolayers presented in mean  $86.8 \pm 13.2\%$  destruction. Interestingly, pEhVps4-E211Q transfected cells were less efficient to destroy MDCK cell monolayers, since they only produced  $46.4 \pm 6.4\%$  cell destruction (see Figure 7(a)).

The rates of erythrophagocytosis of non-transfected clone A, pNEO and pEhVps4 transfected cells were similar, at each time tested. In contrast, pEhVps4-E211Q transfected trophozoites showed 60, 55%, and 57% decrease in erythrophagocytosis rate at 5, 10, and 15 minutes, respectively, when compared with the mean rate from the other trophozoites (see Figure 7(b)).

Then, we investigated the capacity of pEhVps4 and pEhVps4-E211Q transfected trophozoites to induce hepatic abscesses formation in hamsters. None of the six hamsters that were infected with pEhVps4-E211Q transfected trophozoites presented hepatic damage (see Figures 7(c)), whereas

the six animals infected with pNEO and pEhVps4 transfected trophozoites developed extensive abscesses.

3.8. EhVps4 Was Detected around Ingested RBC. To determine the localization of EhVps4 in pEhVps4 transfected trophozoites during erythrophagocytosis, we performed immunofluorescence assays with anti-rEhVps4 serum. Antibodies detected EhVps4 as a signal surrounding ingested erythrocytes, suggesting that this protein may be involved in phagocytosis (see Figure 8).

#### 4. Discussion

In *E. histolytica* trophozoites, phagocytosis, and vesicular trafficking are important events for parasite nutrition and destruction of target cells. As in other eukaryotes, the endocytosis and phagocytosis pathways involve the formation of

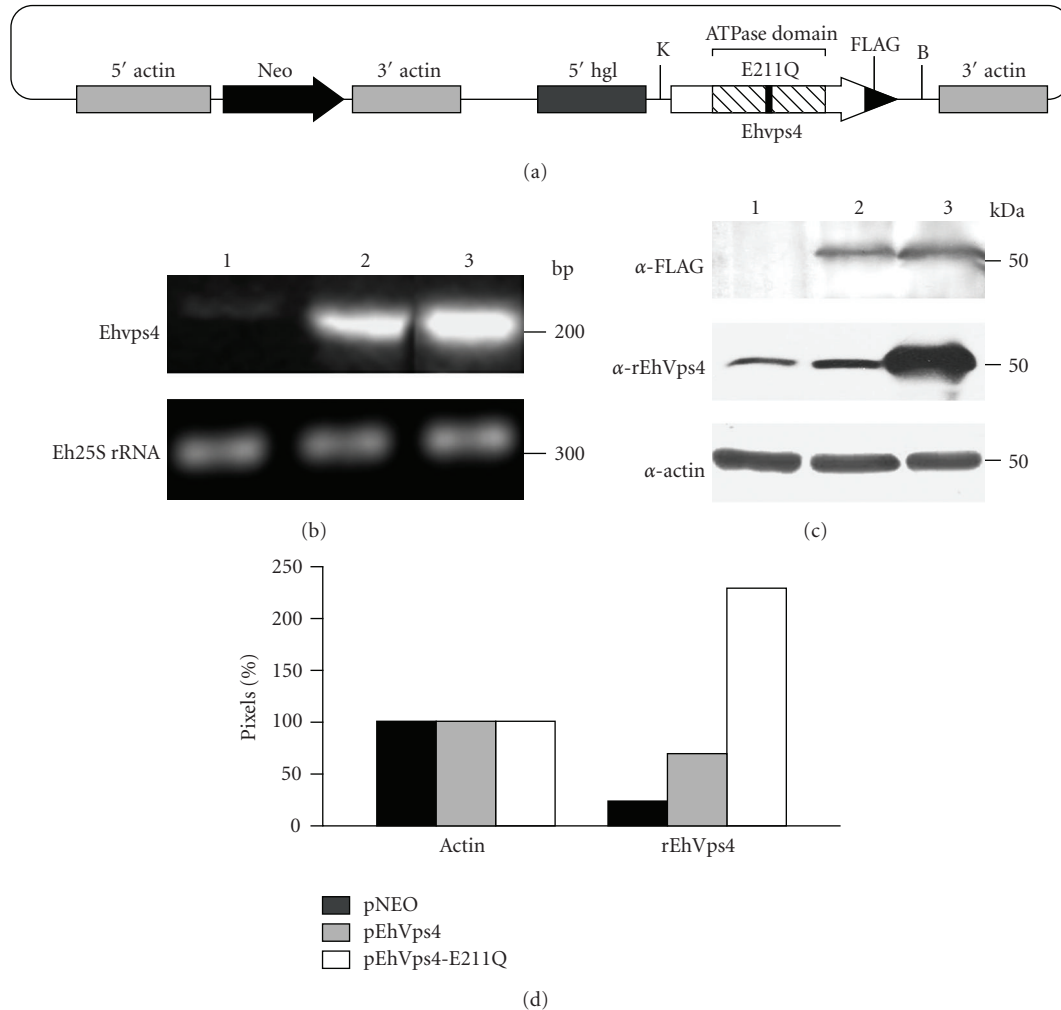


FIGURE 5: Expression of exogenous EhVps4 in transfected trophozoites. (a) Schematic representation of *pEhVps4-E211Q* construct. Mutant *EhVps4* gene was cloned into the *KpnI* and *BamHI* sites of *pNEO* vector, upstream the sequence coding for FLAG epitope. B, *BamHI* site; K, *KpnI* site. (b) 2% agarose gel with RT-PCR assays products. An internal fragment of the *EhVps4* gene (upper panel) or the *Eh25S rRNA* gene (bottom panel) was RT-PCR amplified using 1 µg of total RNA from trophozoites of clone A transfected with *pNEO* (lane 1), *pEhVps4* (lane 2) or *pEhVps4-E211Q* (lane 3) plasmid. (c) Western blot assays. Anti-FLAG (upper panel), anti-rEhVps4 (middle panel) and anti-actin (lower panel) antibodies were used to analyze protein lysates (30 µg) from *pNEO* (lane 1), *pEhVps4* (lane 2) and *pEhVps4-E211Q* (lane 3) transfected cells. (d) Densitometric analysis of bands corresponding to actin and EhVps4 in (c). Pixels corresponding to actin control were taken as 100% in each lane and used to normalize EhVps4 data.

endosomes, MVB and lysosomes [5, 43]. Indeed, MVBl-like structures have been detected in trophozoites [26, 27] and within isolated phagosomes [24], but proteins participating in their formation have not been identified.

Here, by mining the parasite genome sequence, we demonstrated the presence of 20 genes that encode putative ESCRT machinery components, which could participate in endosomal transport and MVB formation in *E. histolytica*. Most predicted proteins have the conserved functional domains and share high similarity and phylogenetic relationship with homologous proteins from other eukaryotes, strongly suggesting that they have similar functions. RT-PCR assays evidenced that 15 out of 16 ESCRT components tested are transcribed, which is consistent with the activity of endosome formation and vesicle trafficking exhibited

by *E. histolytica* trophozoites (reviewed in [5, 43]). Except for the *Ehadh112* and *EhVps23* genes, transcript amount was not significantly modified after 5 minutes of RBC interaction. Analysis of published *E. histolytica* microarrays data confirmed that most ESCRT genes are transcribed without any significant change under distinct experimental conditions [44, 45]. However, these experiments were not focused on phagocytosis. Additionally, in *Dictyostelium discoideum*, microarrays assays evidenced that expression of most genes involved in intracellular vesicle traffic is not significantly changed during phagocytosis [46]. In mouse macrophages, phagocytosis causes cellular redistribution of Hrs protein (the homologue of yeast Vps27p), but the protein amount remains unchanged [47]. It is possible that trophozoites could have enough ESCRT and associated



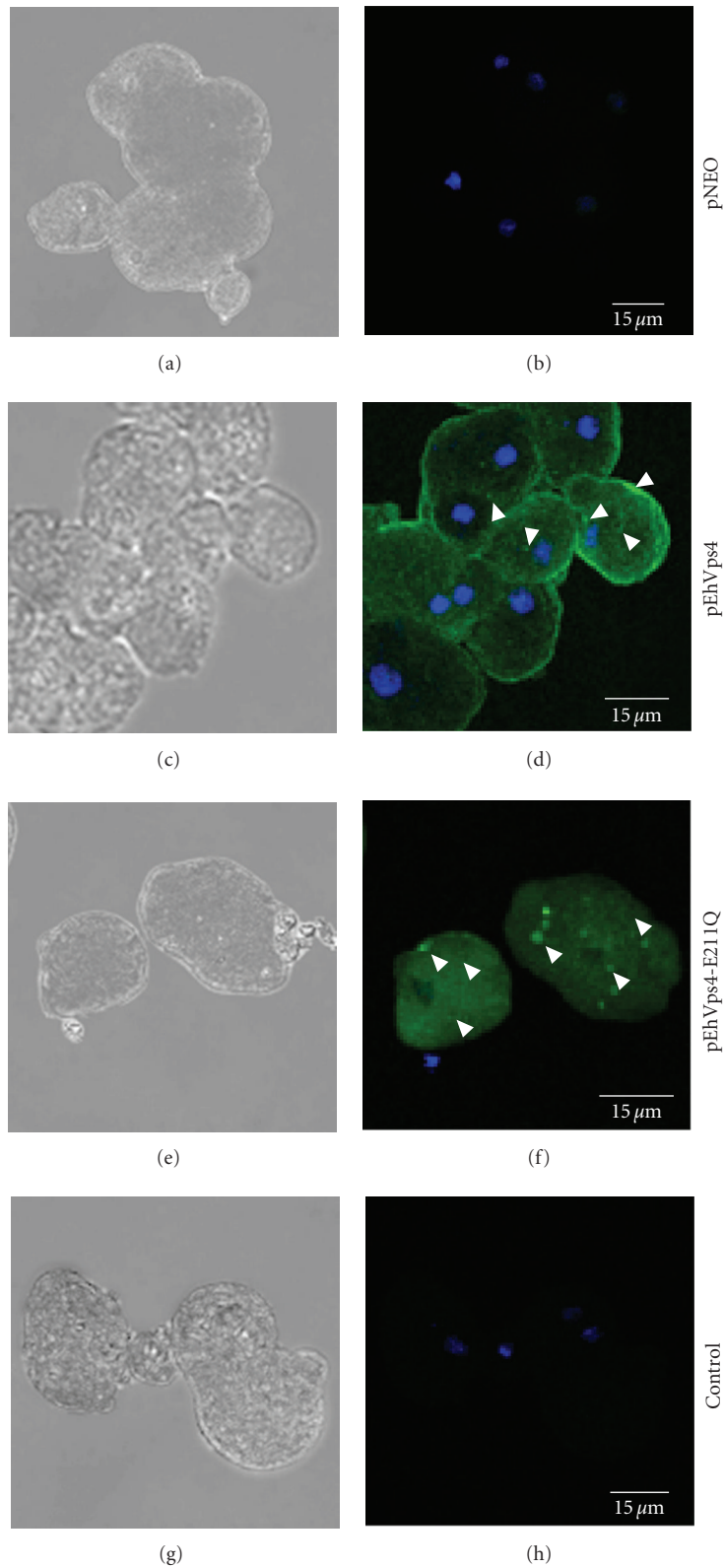


FIGURE 6: Cellular localization of exogenous EhVps4 in transfected trophozoites. Trophozoites transfected with *pNEO* ((a) and (b)), *pEhVps4* ((c) and (d)) and *pEhVps4-E211Q* ((e) and (f)) were incubated with mouse anti-FLAG antibodies, treated with FITC-labeled secondary antibodies, counterstained with DAPI and analyzed through confocal laser microscopy. *pEhVps4-E211Q* transfected trophozoites incubated with FITC-labeled secondary antibodies were used as control ((g) and (h)). (a), (c), (e) and (g) Cells observed in phase contrast; (b), (d), (f) and (h) Merge, trophozoites observed in the green (FITC) and blue (DAPI) channels. Arrowheads, EhVps4 signal in plasma membrane and cytoplasmic dots.

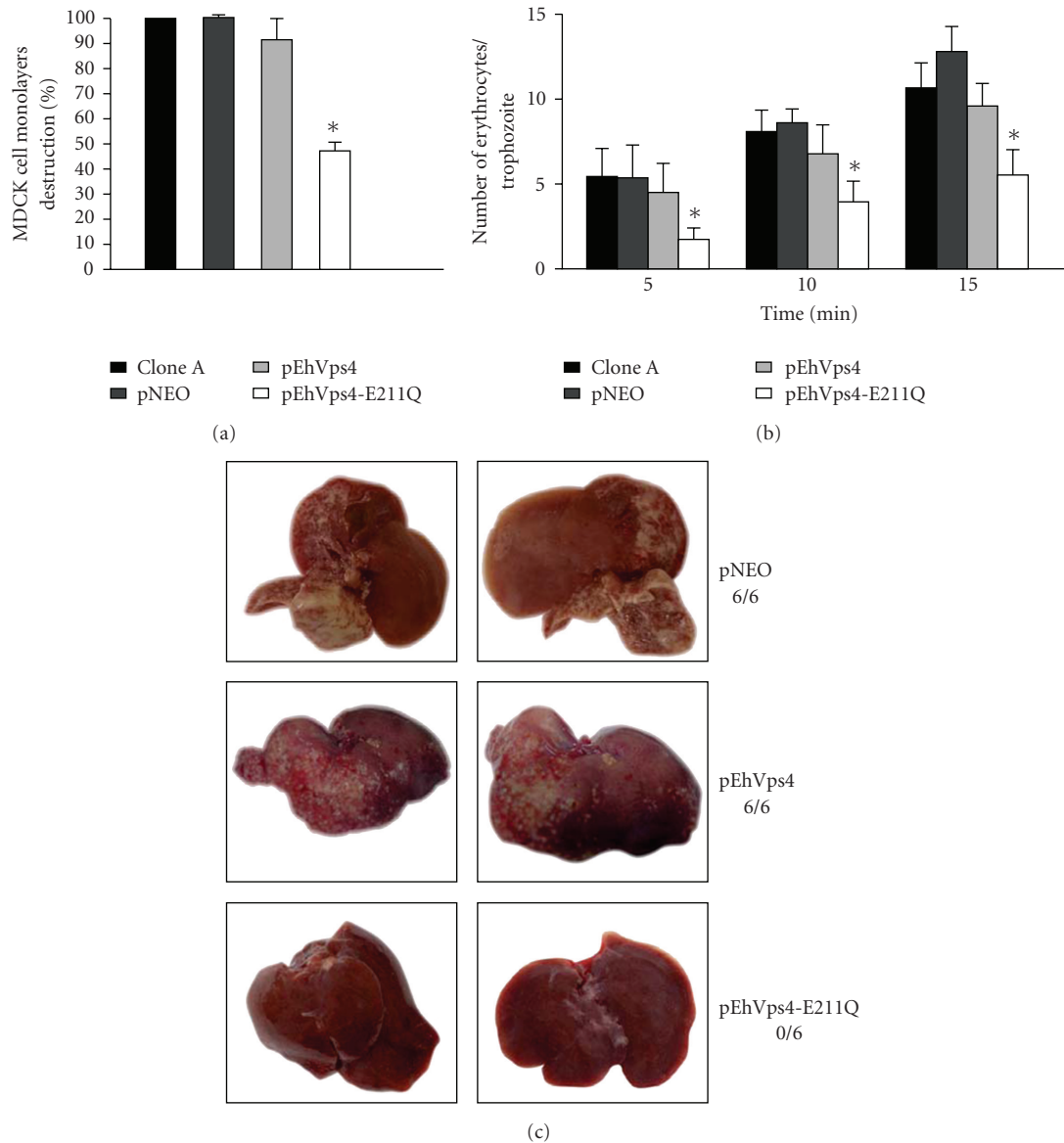


FIGURE 7: Virulence assays of transfected trophozoites. (a) Cytopathic activity. The destruction of MDCK cells monolayers by clone A trophozoites, pNEO, pEhVps4, or pEhVps4-E211Q transfected cells was determined as described [32, 33]. (b) Erythrophagocytosis. Rate of phagocytosis of clone A trophozoites, pEhVps4, pEhVps4-E211Q or pNEO transfected cells was evaluated at 5, 10, and 15 minutes [34]. Histograms show the mean count  $\pm$  SD of three independent experiments by duplicate. (c) Hepatic damage in hamsters infected with transfected trophozoites. Three groups of six hamsters were infected with pNEO, pEhVps4, or pEhVps4-E211Q transfected trophozoites. After 7 days, animals were sacrificed and liver damage was recorded. Pictures were taken from the liver side where the abscesses appeared to be larger and are representative for each group. Upper panels, livers from hamsters infected with pNEO transfected trophozoites (control); middle panels, livers from hamsters infected with pEhVps4 transfected trophozoites; lower panels, livers from hamsters infected with pEhVps4-E211Q transfected trophozoites. 6/6, 6/6 and 0/6 denote number of infected animals/number of inoculated animals.

proteins to perform erythrophagocytosis, if, as we think, these proteins are involved in phagocytosis in *E. histolytica*. However, changes in the gene expression of *E. histolytica* ESCRT members at shorter or larger times cannot be discarded.

In yeast and mammal cells, Vps4 is a key component for disassembly of ESCRT complexes from the endosomal membrane at the MVB invagination pathway [42, 48, 49]. We focused on EhVps4 protein to investigate its role in

endocytosis, specifically in one of the “professional function” of *E. histolytica* trophozoites: phagocytosis. As in yeast, *E. histolytica* has only one *vps4* gene, while higher eukaryotes have two *vps4* genes [21, 50, 51]. By confocal microscopy, EhVps4 was immunodetected as abundant small dots dispersed in the cytosol. In yeast, mammals, plants, and the protozoan *Leishmania major*, similar structures have been identified as MVB formed during endocytosis and vesicular trafficking [22, 42, 51, 52].

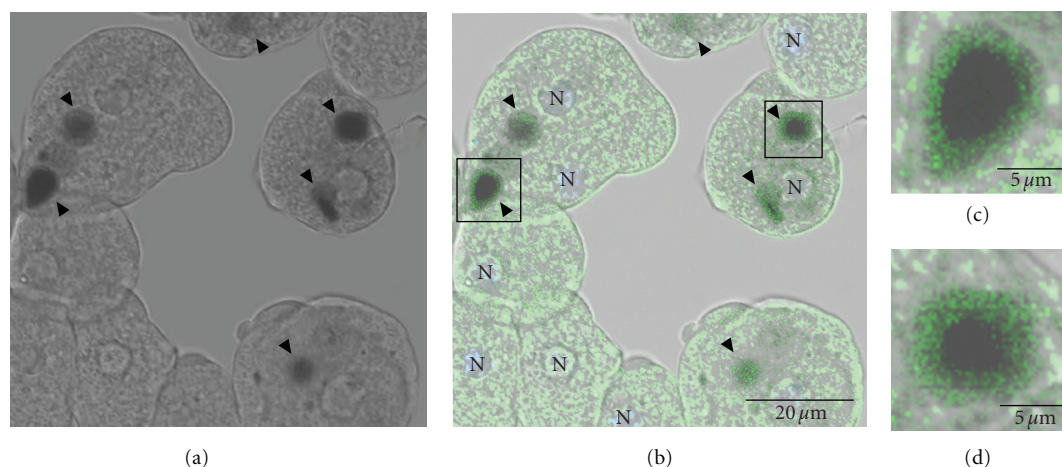


FIGURE 8: Cellular localization of EhVps4 protein during erythrophagocytosis. Trophozoites transfected with p*EhVps4* were incubated with RBC, treated with diaminobenzidine, anti-rEhVps4 and FITC-labeled secondary antibodies, and analyzed through confocal laser microscopy. (a) Cells observed in phase contrast. (b) Trophozoites observed in the green (FITC) channel and phase contrast. (c) Magnification of diaminobenzidine stained RBC squared in (b). Arrowhead, EhVps4 signal around RBC. N, nuclei.

Yeast Vps4p protein exhibits ATPase activity, which depends on the E233 residue present within the AAA domain [18, 42]. In this work, we showed that EhVps4 is an ATPase, which conserves the characteristic domains and folding of Vps4 homologues. This activity depends on the AAA domain since the mutant rEhVps4-E211Q-GST, in which E211 amino acid residue was substituted by Q residue, did not exhibit detectable ATP hydrolysis, as reported in yeast [18, 42].

We further investigated the biological relevance of EhVps4 by generating trophozoites that overexpress wild type EhVps4-FLAG and mutant EhVps4-E211Q-FLAG protein. As the endogenous protein, exogenous EhVps4-FLAG was located in abundant punctuate structures in the cytosol as reported in other organisms [42, 50, 52, 53]. However, overexpressed EhVps4-FLAG was also detected at plasma membrane. In transfected mammal cells that overexpress Sendai virus protein C and wild type Vps4, ALIX/AIP1 proteins are recruited at the plasma membrane to facilitate the budding of virus-like particles [54]. EhADH112, the *E. histolytica* homologue of ALIX, has been detected at the plasma membrane [55]. Experiments currently in progress will help us to define the role of Vps4 at the membrane of trophozoites.

Erythrophagocytosis and cytopathic activities were not improved in trophozoites overexpressing wild type EhVps4-FLAG, probably because other ESCRT proteins are limiting factors for cell destruction and RBC intake [42, 52, 56]. However, the dominant negative effect of mutant EhVps4-E211Q-FLAG protein in MDCK cells destruction, the rate of RBC intake, and liver abscesses formation in hamsters, suggest a role for EhVps4 in *E. histolytica* virulence properties. The localization of EhVps4-FLAG protein around ingested RBC strengthens this hypothesis.

In conclusion, we showed that *E. histolytica* has an ESCRT machinery, which is transcribed in trophozoites. Particularly, we presented evidence that the conserved EhVps4

is an ATPase that could participate in cytopathic activity and erythrophagocytosis, as well as in hepatic damage in hamster. Work currently in progress is focusing on the identification of cytoplasmic structures containing EhVps4, as well as its interaction with other components of the *E. histolytica* ESCRT machinery.

## Acknowledgments

Monoclonal antiactin antibodies were gently provided by Dr. Manuel Hernández (CINVESTAV-IPN). The authors are grateful to M. Sc. Eduardo Carrillo (UACM) for laser confocal microscopy assistance. Their thanks are also to Alfredo Padilla (ICyTDF) for his help in the artwork. This work was supported by a Grant from CONACyT (Mexico) and by CYCYT Grant BFU2005-01970 (to O. Vincent).

## References

- [1] M. D. Abd-Alla, T. F. H. G. Jackson, S. Reddy, and J. I. Ravdin, "Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 6, pp. 2344–2347, 2000.
- [2] M. A. Rodríguez, R. M. García-Pérez, G. García-Rivera, et al., "An *Entamoeba histolytica* Rab-like encoding gene and protein: function and cellular location," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 108, no. 2, pp. 199–206, 2000.
- [3] S. Marion, C. Laurent, and N. Guillén, "Signalization and cytoskeleton activity through myosin IB during the early steps of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*: a proteomic approach," *Cellular Microbiology*, vol. 7, no. 10, pp. 1504–1518, 2005.
- [4] K. Nakada-Tsukui, Y. Saito-Nakano, V. Ali, and T. Nozaki, "A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16, no. 11, pp. 5294–5303, 2005.

- [5] W. de Souza, C. Sant'Anna, and N. L. Cunha-e-Silva, "Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa," *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 44, no. 2, pp. 67–124, 2009.
- [6] J. H. Hurley and S. D. Emr, "The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network," *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 35, pp. 277–298, 2006.
- [7] R. L. Williams and S. Urbé, "The emerging shape of the ESCRT machinery," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 5, pp. 355–368, 2007.
- [8] T. E. Rusten and H. Stenmark, "How do ESCRT proteins control autophagy?" *Journal of Cell Science*, vol. 122, no. 13, pp. 2179–2183, 2009.
- [9] C. K. Raymond, I. Howald-Stevenson, C. A. Vater, and T. H. Stevens, "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 3, no. 12, pp. 1389–1402, 1992.
- [10] T. Wollert, D. Yang, X. Ren, H. H. Lee, Y. J. Im, and J. H. Hurley, "The ESCRT machinery at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 122, no. 13, pp. 2163–2166, 2009.
- [11] D. J. Katzmman, M. Babst, and S. D. Emr, "Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I," *Cell*, vol. 106, no. 2, pp. 145–155, 2001.
- [12] M. Curtiss, C. Jones, and M. Babst, "Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 18, no. 2, pp. 636–645, 2007.
- [13] M. Babst, D. J. Katzmman, W. B. Snyder, B. Wendland, and S. D. Emr, "Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body," *Developmental Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 283–289, 2002.
- [14] M. Babst, D. J. Katzmman, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr, "ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting," *Developmental Cell*, vol. 3, no. 2, pp. 271–282, 2002.
- [15] G. Odorizzi, D. J. Katzmman, M. Babst, A. Audhya, and S. D. Emr, "Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Cell Science*, vol. 116, no. 10, pp. 1893–1903, 2003.
- [16] J. Kim, S. Sitaraman, A. Hierro, B. M. Beach, G. Odorizzi, and J. H. Hurley, "Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain," *Developmental Cell*, vol. 8, no. 6, pp. 937–947, 2005.
- [17] N. Luhtala and G. Odorizzi, "Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes," *The Journal of Cell Biology*, vol. 166, no. 5, pp. 717–729, 2004.
- [18] M. Babst, T. K. Sato, L. M. Banta, and S. D. Emr, "Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p," *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 8, pp. 1820–1831, 1997.
- [19] P. I. Hanson and S. W. Whiteheart, "AAA+ proteins: have engine, will work," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 6, no. 7, pp. 519–529, 2005.
- [20] M. Finken-Eigen, R. A. Rohricht, and K. Kohrer, "The VPS4 gene is involved in protein transport out of a yeast prevacuolar endosome-like compartment," *Current Genetics*, vol. 31, no. 6, pp. 469–480, 1997.
- [21] T. Yoshimori, F. Yamagata, A. Yamamoto, et al., "The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 747–763, 2000.
- [22] T. J. Haas, M. K. Sliwinski, D. E. Martínez, et al., "The *Arabidopsis* AAA ATPase SKD1 is involved in multivesicular endosome function and interacts with its positive regulator LYST-INTERACTING PROTEIN5," *The Plant Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 1295–1312, 2007.
- [23] M. Okada and T. Nozaki, "New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis," *Archives of Medical Research*, vol. 37, no. 2, pp. 244–252, 2006.
- [24] M. Okada, C. D. Huston, B. J. Mann, W. A. Petri Jr., K. Kita, and T. Nozaki, "Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*," *Eukaryotic Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 827–831, 2005.
- [25] M. Okada, C. D. Huston, M. Oue, et al., "Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 145, no. 2, pp. 171–183, 2006.
- [26] C. Bañuelos, I. López-Reyes, G. García-Rivera, A. González-Robles, and E. Orozco, "The presence of a Snf7-like protein strenghtens a role for EhADH in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway," in *Proceedings of the 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health*, M. J. Boeree, Ed., vol. 978, pp. 31–35, Amsterdam, The Netherlands, May 2007, PP-292.
- [27] C. Bañuelos, G. García-Rivera, I. López-Reyes, and E. Orozco, "Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein," *Experimental Parasitology*, vol. 110, no. 3, pp. 292–297, 2005.
- [28] N. Saitou and M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, no. 4, pp. 406–425, 1987.
- [29] S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei, "MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 5, no. 2, pp. 150–163, 2004.
- [30] L. S. Diamond, D. R. Harlow, and C. C. Cunnick, "A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 4, pp. 431–432, 1978.
- [31] Student, "The probable error of a mean," *Biometrika*, vol. 6, pp. 1–25, 1908.
- [32] Ch. Avila, B. A. Kornilayev, and B. S. J. Blagg, "Development and optimization of a useful assay for determining Hsp90's inherent ATPase activity," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 4, pp. 1134–1142, 2006.
- [33] L. Hamann, R. Nickel, and E. Tannich, "Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 19, pp. 8975–8979, 1995.
- [34] M.-K. Sung, C. W. Ha, and W.-K. Huh, "A vector system for efficient and economical switching of C-terminal epitope tags in *Saccharomyces cerevisiae*," *Yeast*, vol. 25, no. 4, pp. 301–311, 2008.
- [35] E. Orozco, A. Martínez-Palomo, and R. López-Revilla, "An in vitro model for the quantitative study of the virulence of *Entamoeba histolytica*," *Archivos de Investigación Médica*, vol. 9, supplement 1, pp. 257–260, 1978.
- [36] R. Bracha and D. Mirelman, "Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions,



- and metronidazole," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 160, no. 2, pp. 353–368, 1984.
- [37] E. Orozco, G. Guarneros, A. Martínez-Palomo, and T. Sánchez, "Entamoeba histolytica. Phagocytosis as a virulence factor," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 158, no. 5, pp. 1511–1521, 1983.
- [38] V. Tsutsumi, R. Mena-López, F. Anaya-Velázquez, and A. Martínez-Palomo, "Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation," *American Journal of Pathology*, vol. 117, no. 1, pp. 81–91, 1984.
- [39] J. H. Hurley and D. Yang, "MIT domainia," *Developmental Cell*, vol. 14, no. 1, pp. 6–8, 2008.
- [40] J. Xiao, H. Xia, J. Zhou, et al., "Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway," *Developmental Cell*, vol. 14, no. 1, pp. 37–49, 2008.
- [41] B. Loftus, I. Anderson, R. Davies, et al., "The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*," *Nature*, vol. 433, no. 7028, pp. 865–868, 2005.
- [42] M. Babst, B. Wendland, E. J. Estepa, and S. D. Emr, "The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function," *The EMBO Journal*, vol. 17, no. 11, pp. 2982–2993, 1998.
- [43] I. Meza and M. Clarke, "Dynamics of endocytic traffic of *Entamoeba histolytica* revealed by confocal microscopy and flow cytometry," *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 59, no. 4, pp. 215–226, 2004.
- [44] J. Santi-Rocca, C. Weber, G. Guigon, O. Sismeiro, J.-Y. Coppée, and N. Guillén, "The lysine- and glutamic acid-rich protein KERP1 plays a role in *Entamoeba histolytica* liver abscess pathogenesis," *Cellular Microbiology*, vol. 10, no. 1, pp. 202–217, 2008.
- [45] J. B. Vicente, G. M. Ehrenkaufer, L. M. Saraiva, M. Teixeira, and U. Singh, "*Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis," *Cellular Microbiology*, vol. 11, no. 1, pp. 51–69, 2009.
- [46] A. Sillo, G. Bloomfield, A. Balest, et al., "Genome-wide transcriptional changes induced by phagocytosis or growth on bacteria in *Dictyostelium*," *BMC Genomics*, vol. 9, article 291, 2008.
- [47] O. V. Vieira, R. E. Harrison, C. C. Scott, et al., "Acquisition of Hrs, an essential component of phagosomal maturation, is impaired by mycobacteria," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 10, pp. 4593–4604, 2004.
- [48] M. Sachse, G. J. Strous, and J. Klumperman, "ATPase-deficient hVPS4 impairs formation of internal endosomal vesicles and stabilizes bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles," *Journal of Cell Science*, vol. 117, no. 9, pp. 1699–1708, 2004.
- [49] N. Bishop and P. Woodman, "ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 227–239, 2000.
- [50] S. Scheuring, R. A. Rohricht, B. Schoning-Burkhardt, et al., "Mammalian cells express two VPS4 proteins both of which are involved in intracellular protein trafficking," *Journal of Molecular Biology*, vol. 312, no. 3, pp. 469–480, 2001.
- [51] A. Beyer, S. Scheuring, S. Muller, A. Mincheva, P. Lichter, and K. Kohrer, "Comparative sequence and expression analyses of four mammalian VPS4 genes," *Gene*, vol. 305, no. 1, pp. 47–59, 2003.
- [52] S. Besteiro, R. A. M. Williams, L. S. Morrison, G. H. Coombs, and J. C. Mottram, "Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 16, pp. 11384–11396, 2006.
- [53] M. Yang, I. Coppens, S. Wormsley, P. Baevova, H. C. Hoppe, and K. A. Joiner, "The *Plasmodium falciparum* Vps4 homolog mediates multivesicular body formation," *Journal of Cell Science*, vol. 117, no. 17, pp. 3831–3838, 2004.
- [54] T. Irie, N. Nagata, T. Yoshida, and T. Sakaguchi, "Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles," *Virology*, vol. 371, no. 1, pp. 108–120, 2008.
- [55] G. García-Rivera, M. A. Rodríguez, R. Ocádiz, et al., "*Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein," *Molecular Microbiology*, vol. 33, no. 3, pp. 556–568, 1999.
- [56] H. Fujita, M. Yamanaka, K. Imamura, et al., "A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells," *Journal of Cell Science*, vol. 116, no. 2, pp. 401–414, 2003.



## Research Article

# EhADH112 Is a Bro1 Domain-Containing Protein Involved in the *Entamoeba histolytica* Multivesicular Bodies Pathway

Cecilia Bañuelos,<sup>1,2</sup> Guillermina García-Rivera,<sup>1</sup> Israel López-Reyes,<sup>2</sup> Leobardo Mendoza,<sup>3</sup> Arturo González-Robles,<sup>1</sup> Silvia Herranz,<sup>4</sup> Olivier Vincent,<sup>4</sup> and Esther Orozco<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 07360 México, DF, Mexico

<sup>2</sup>Centro de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del Distrito Federal, Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, 06010 México, DF, Mexico

<sup>3</sup>Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, 11340 México, DF, Mexico

<sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC-UAM, 28029 Madrid, Spain

<sup>5</sup>Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, 03100 México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Esther Orozco, orozco.esther@gmail.com

Received 16 July 2011; Accepted 3 October 2011

Academic Editor: Luis I. Terrazas

Copyright © 2012 Cecilia Bañuelos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

EhADH112 is an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein, structurally related to mammalian ALIX and yeast BRO1, both involved in the Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT)-mediated multivesicular bodies (MVB) biogenesis. Here, we investigated an alternative role for EhADH112 in the MVB protein trafficking pathway by overexpressing 166 amino acids of its N-terminal Bro1 domain in trophozoites. Trophozoites displayed diminished phagocytosis rates and accumulated exogenous Bro1 at cytoplasmic vesicles which aggregated into aberrant complexes at late stages of phagocytosis, probably preventing EhADH112 function. Additionally, the existence of a putative *E. histolytica* ESCRT-III subunit (EhVps32) presumably interacting with EhADH112, led us to perform pull-down experiments with GST-EhVps32 and [<sup>35</sup>S]-labeled EhADH112 or EhADH112 derivatives, confirming EhVps32 binding to EhADH112 through its Bro1 domain. Our overall results define EhADH112 as a novel member of ESCRT-accessory proteins transiently present at cellular surface and endosomal compartments, probably contributing to MVB formation during phagocytosis.

## 1. Introduction

*Entamoeba histolytica*, the causative agent of human amoebiasis provokes the second worldwide highest rates of morbidity and mortality due to protozoa [1]. *E. histolytica* trophozoites obtain host nutrients from a very active uptake and efficient engulfment of bacteria, red blood cells (RBC), and cell debris [2], which makes them to be considered as professional phagocytes. Since *E. histolytica* phagocytosis-deficient mutants have a diminished virulence *in vitro* and *in vivo* [3, 4], and nonvirulent *E. histolytica* strains exhibit reduced rates of phagocytosis [5], this cellular event has been defined as a key virulence factor.

EhCPADH, an *E. histolytica* protein complex formed by the EhADH112 adhesin and the EhCP112 cysteine protease,

has been widely involved in adherence to, phagocytosis, and destruction of target cells [6]. Bioinformatics analysis revealed that EhADH112 is structurally related to mammalian ALIX [7], an evolutionarily conserved, ubiquitously expressed and multifunction scaffold protein, originally identified by its association with proapoptotic signaling partners [8, 9]. Additional evidence has established that ALIX modulates other cellular mechanisms, including receptor downregulation [10, 11], endosomal protein sorting [12–14], integrin-mediated cell adhesion and extracellular matrix assembly [15], actin-based cytoskeleton remodeling [16, 17], and membrane invagination and abscission in cytokinesis and retroviral budding [18].

ALIX is an abundant cytoplasmic protein with a multimodular architecture containing an N-terminal “banana”-

shaped Bro1 domain [19], a middle “V”-shaped domain [20] and a C-terminal proline-rich region [21]. This tripartite domain organization occurs in the majority of ALIX orthologues and provides them multiple protein-binding sites for specific roles in several cellular processes, and the possibility of linking proteins into distinct networks, thus acting as scaffold proteins [22].

Much of what is known about ALIX has stemmed from the characterization of its closest orthologue, yeast BRO1, a crucial component of the Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) pathway [23, 24]. The ESCRT machinery comprises a set of protein complexes (ESCRT-0, -I, -II, -III, and -associated proteins) most of them constituted by the so-called Vacuolar protein sorting (Vps) factors. The assembly of the ESCRT apparatus at the endosomal surface is required to selectively transport ubiquitinated receptors and other cargo proteins into late endosomes known as multivesicular bodies (MVB), towards final degradation into the vacuole or lysosome [25, 26]. In this process, human ALIX or yeast BRO1 promotes endosomal membrane scission for intraluminal vesicles formation of MVB, driven by the direct association of their N-terminal Bro1 domains to the human CHMP4 or yeast Vps32 (also named Snf7) ESCRT-III subunits, respectively [19, 20].

Despite significant advances in the understanding of EhADH112 functions related to parasite virulence [6], its structural relationship with ALIX and BRO1 proteins [7] and recent evidence regarding the existence of most ESCRT components [27] and MVB-like organelles in *E. histolytica* [28], the potential role of EhADH112 in ESCRT-dependent protein sorting and trafficking along the MVB pathway had not yet been explored. The Bro1 domain occurs in a wide group of eukaryotic proteins that serve as scaffold for linking different cellular networks, including MVB formation dependent on ESCRT. In fact, a well-known hallmark for Bro1 domain functionality is its ability to bind to ESCRT-III subunits. Here, we initiated the characterization of the N-terminal residues comprising the small EhADH112 Bro1 domain originally defined by the Pfam protein domain database [29], but later extended by crystallographic experiments [19]. The tertiary structure modeling of EhADH112, presented in this study, predicted the spatial conformation needed for putative interaction with ESCRT-III subunits via the Bro1 domain. To explore if EhADH112 could be involved in MVB formation during phagocytosis, we generated a trophozoite population (ANeoBro1) overexpressing the first 166 amino acids of the EhADH112 Bro1 domain. ANeoBro1 trophozoites dramatically diminished their rates of phagocytosis, possibly due to an impairment of EhADH112 functions, seemingly produced by exogenous Bro1 accumulation in cytoplasmic vesicles and aberrant complexes, and its absence in plasma membrane and phagosomes, where EhADH112 exerts its role for target cell adherence and phagocytosis. Electron immunolocalization of EhADH112 in structures resembling MVB, together with its finding in both soluble and insoluble subcellular fractions, suggested its participation in MVB formation. Moreover, EhADH112 *in vitro* binding to a protein homologous to Vps32 (EhVps32), strengthened our hypothesis regarding the EhADH112

contribution to ESCRT-mediated protein sorting along the MVB pathway by virtue of its Bro1 domain. Altogether, our results define EhADH112 as a novel member of Bro1 domain-containing proteins present at cellular surface and endosomal compartments with a potential role in the MVB pathway.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Tertiary (3D) Protein Modeling.** The EhADH112 primary sequence was submitted to the Phyre Server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>) and validated by the Swiss Model Database. EhADH112 3D modeling was performed with human ALIX (2oev) and yeast BRO1 (1z1b) crystallized sequences as templates. Results were documented and analyzed through the DeepView-Swiss-Pdb Viewer software.

**2.2. *E. histolytica* Cultures.** Trophozoites of clone A (strain HM1: IMSS) were axenically cultured in TYI-S-33 medium at 37°C [30]. Medium for transfected trophozoites (ANeo, ANeoADH112 and ANeoBro1 populations) was supplemented with 40 µg/mL geneticin (G418) (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Trophozoites were harvested in logarithmic growth phase for all experiments and cell viability was monitored by microscopy using Trypan blue dye exclusion tests.

**2.3. PCR Amplification of the Bro1-FLAG Encoding Fragment.** A 498 bp fragment from the 5' end of the *EhAdh112* gene, corresponding to the first 166 amino acids of the EhADH112-Bro1 domain was PCR-amplified, using the sense (1–24 *EhAdh112* nt) 5'-GGGGTACCATGAATAGACAATTCATTCCTGAA-3' and the antisense (477–497 *EhAdh112* nt) 5'-CGGGATCCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCACTACCTGCTGCACATAGTTGG-3' oligonucleotides, 10 mM dNTPs, 100 ng of *E. histolytica* genomic DNA as template and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco). PCR was carried out for 30 cycles comprising 1 min at 94°C, 30 sec at 59°C, and 40 sec at 72°C. The sense oligonucleotide contained a *KpnI* restriction site, whereas the antisense oligonucleotide contained the FLAG (DYKDDDDK) tag-encoding sequence (underlined) [31] and a *BamH1* restriction site. Oligonucleotides used in this work specifically recognize sequences present in the *EhAdh112* gene but not those present in the previously reported *EhAdh112*-like genes [7].

**2.4. Generation of ANeoBro1 Trophozoites by Transfection with the pNeoBro1FLAG Plasmid.** The PCR-amplified product (*Bro1FLAG*) was cloned into the *BamH1* and *KpnI* sites of the pExEhNeo (pNeo) plasmid, which contains *E. histolytica*-specific transcription signals and the G418 resistance (*Neo<sup>R</sup>*) conferring gene as selectable marker [32], producing the pNeoBro1FLAG construct. *Escherichia coli* DH5α bacteria were transformed with the pNeoBro1FLAG or pNeo plasmids. Both plasmids were purified using the QIAGEN Maxi kit (Chatsworth, CA) and automatically sequenced. Plasmids



(200  $\mu\text{g}$ ) were transfected by electroporation as previously described [32] into exponentially growing trophozoites of clone A, generating the ANeo and ANeoBro1 trophozoite populations.

**2.5. RT-PCR Experiments.** cDNAs were synthesized using 1  $\mu\text{g}$  of DNase-treated total RNA, 10 mM dNTPs, 200 U AMV reverse transcriptase (Gibco) and 0.5  $\mu\text{g}$  of oligo dT (Gibco) in a final volume of 10  $\mu\text{L}$ , for 1 h at 42°C. PCR amplifications were carried out using 4  $\mu\text{L}$  (~330 ng) of cDNA, 1 U of *Taq* polymerase, 2 mM dNTPs, and 100 ng of the sense (1–24 nt) and the antisense (477–497 nt) oligonucleotides from the *EhAdh112* gene. Additionally, the sense (1–17 nt) 5'-ATGATTGAACAAGATGG-3' and the antisense (780–794 nt) 5'-TTAGAAGAAGCTCGTC-3' primers were used to amplify a 794 bp fragment of the *Neo<sup>R</sup>* gene. Each PCR was performed as described above. Amplified products were separated by 1% agarose gel electrophoresis, ethidium bromide-stained and visualized in a Gel Doc 1000 apparatus (BioRad).

**2.6. Immunofluorescence Assays.** Trophozoites grown on coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma) at 37°C for 1 h, permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS (PBS-Triton) for 30 min and incubated with 1% bovine serum albumin (BSA) for 40 min at 37°C. Trophozoites were incubated with mouse monoclonal antibodies against EhADH112 ( $\text{m}\alpha\text{EhADH112}$ ) (1 : 10) or rabbit polyclonal anti-FLAG ( $\text{p}\alpha\text{FLAG}$ ) (USBiological) antibodies (1 : 500), overnight (ON) at 4°C, followed by incubation with fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (1 : 100) (Zymed), respectively, for 1 h at 37°C.

For colocalization experiments, PFA-fixed trophozoites were incubated ON at 4°C with  $\text{m}\alpha\text{EhADH112}$  and  $\text{p}\alpha\text{FLAG}$  antibodies, followed (1 h at 37°C) by FITC-labeled anti-mouse IgM and tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate-(TRITC)-labeled anti-rabbit IgG secondary antibodies. For some experiments, trophozoites were first incubated with fresh RBC (1 : 40) for different times at 37°C, fixed with PFA, contrasted with 3 mM diaminobenzidine (DAB) and treated for immunofluorescence assays as above. All preparations were preserved using the antifade reagent Vectashield (Vector) and examined through a Nikon inverted microscope attached to a laser confocal scanning system (Leica).

**2.7. Adherence and Phagocytosis Kinetics.** Trophozoites were incubated for 5, 10, and 15 min with freshly obtained human RBC ( $10^8$  cells/mL) (1 : 100 ratio) at 4°C for adherence, or at 37°C for phagocytosis experiments [33]. RBC were contrasted with DAB and counted at random from three independent experiments to determine the number of RBC adhered to or ingested by 100 trophozoites.

**2.8. Transmission Electron Microscopy (TEM) Assays.** Fast-freeze fixation followed by cryosubstitution was used for ultrastructural location of EhADH112 and the FLAG-tagged Bro1 recombinant polypeptide. Transfected trophozoites were pelleted and placed into the hole of a 7 mm diameter

antiadhesive plastic ring positioned on a foam rubber support and frozen on a copper mirror precooled to liquid nitrogen temperature using a Reichert KF 80 unit. Freeze substitution was achieved with a Reichert CS autosystem in acetone containing 4% osmium tetroxide for 48 h at –80°C. Afterwards, samples were brought to room temperature at a rate of 4°C/h and embedded in epoxy resins. Ultrathin sections were obtained and stained with uranyl acetate and lead citrate. For immunogold labeling, thin sections were placed on formvar-coated nickel grids and incubated for 15 min in 0.1 M ammonium chloride. Then, sections were washed twice with PBS (5 min each), blocked with 1% BSA for 15 min, and incubated with polyclonal rabbit anti-EhADH112 ( $\text{p}\alpha\text{EhADH112}$ ) or monoclonal mouse anti-FLAG ( $\text{m}\alpha\text{FLAG}$ ) (Sigma) antibodies at 1 : 50 or 1 : 20 dilutions, respectively, for 60 min. Then, sections were washed and incubated for 1 h with goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (1 : 20) antibodies conjugated to 15 nm colloidal gold (BBI International, Cardiff, UK). Finally, sections were washed and treated as above to be observed through a Zeiss EM 910 electron microscope. For phagocytosis experiments, trophozoites were first incubated with fresh RBC (1 : 40 ratio) at 37°C for 15 min and treated for TEM as described.

**2.9. Isolation of *E. histolytica* Membranes.** *E. histolytica* cellular fractions were obtained as described by Aley et al. [34]. Briefly, trophozoites from wild-type clone A ( $40 \times 10^6$ ) were harvested, washed twice with 19 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, and 0.27 M NaCl (PD solution) and pooled. Cell pellet was resuspended to  $2 \times 10^7$  cells/mL PD solution containing 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and rapidly mixed with an equal volume of 1 mg/mL concanavalin A in the same buffer. After 5 min, cells were spun at  $50 \times g$  for 1 min to remove the excess of concanavalin A. The supernatant was discarded and cell pellet was resuspended in 12 mL of 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ . After 10 min swelling in hypotonic buffer, cells were homogenized by 18–20 strokes of a glass Dounce homogenizer with a tight-fitting pestle (Wheaton Scientific Div.). Cell lysis and membrane sheets formation were verified by phase-contrast microscopy. The homogenate was layered over a two-step gradient consisting of 8 mL of 0.5 M mannitol over 4 mL of 0.58 M sucrose, both in Tris buffer, and spun at  $250 \times g$  for 30 min. Material remaining at the top of the 0.5 M mannitol (SN1) was centrifuged at  $40\,000 \times g$  for 1 h to separate soluble molecules (SN2) from small membrane fragments and vesicles (P2). Large plasma membrane fragments and other heavy debris formed a tight pellet at the bottom of the gradient (P1). This pellet was resuspended in 1 mL Tris buffer containing 1 M  $\alpha$ -methyl mannoside and left on ice for 40 min with occasional mixing. Plasma membranes free of concanavalin A were diluted into three volumes of Tris buffer, homogenized by 80 strokes with a glass Dounce homogenizer, layered on a 20% sucrose Tris gradient and spun for 30 min at  $250 \times g$ . Vesiculated plasma membranes floating above the initial sucrose layer (SN3) were collected and then concentrated by centrifugation at  $40\,000 \times g$  for 1 h. The pellet (P4), enriched

in plasma membranes, was resuspended in Tris buffer. All steps were performed at 4°C. Samples (50 µg) were analyzed by SDS-PAGE (10%) and transferred onto nitrocellulose membranes for Western blot assays using rabbit polyclonal antibodies against the last C-terminal 243 amino acids of EhADH112 (pαEhADH243) and peroxidase-labeled anti-rabbit IgG secondary antibodies, at 1:300 and 1:10 000 dilutions, respectively. As a control, mouse monoclonal anti-*E. histolytica* actin and peroxidase-labeled anti-IgG corresponding secondary antibodies were used at 1:1 500 and 1:10 000, respectively.

**2.10. In Vitro Binding Assays.** A plasmid encoding glutathione S-transferase (GST)-*EhVps32* was constructed by inserting a PCR fragment containing the *EhVps32* coding sequence into the *Bam*H1 site of pGEX-5X-1 (Pharmacia). Plasmids used for *in vitro* synthesis of *EhAdh112* and *EhAdh112*-truncated derivatives were constructed by inserting PCR-amplified or restriction fragments containing the corresponding EhADH112 coding sequences in the polylinker of pGBKT7 (Clontech). GST-*EhVps32* and GST alone were expressed in *E. coli* BL21 bacteria. Cultures (50 mL) were induced at 30°C after addition of 0.1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and incubated for additional 2.5 h before proceeding with the GST fusion protein purification [35]. [<sup>35</sup>S]-EhADH112 and [<sup>35</sup>S]-EhADH112 truncated derivatives were synthesized *in vitro* using the Promega TNT coupled transcription-translation system in the presence of [<sup>35</sup>S] methionine (1 000 Ci/mmol). Labeling reaction (2 µl) was added to glutathione beads loaded with GST-*EhVps32* or GST proteins and incubated at 4°C for 1 h in 500 mL of a 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA and 150 mM NaCl solution (STE) with 1% (v/v) Triton X-100. After five washes with STE/1% Triton X-100, beads were boiled in sample buffer and proteins were separated by 10% polyacrylamide SDS-PAGE. Bound proteins were detected by autoradiography or Coomassie blue staining of gels.

### 3. Results and Discussion

**3.1. Tertiary Structure Modeling of EhADH112 Predicts Conformational Similarities to ALIX.** Bro1 domain-containing proteins are highly conserved among eukaryotes and exhibit distinct functions in several cellular processes (Figure 1(a)), depending on the partners they interact with [22]. EhADH112 displays 40% homology and 20% identity to human ALIX [7] and its primary sequence aligns with the portion of ALIX corresponding to the N-terminal Bro1 and the middle “V” domains. More divergent relatives of ALIX only contain the Bro1 domain but otherwise, bear little resemblance to the remaining structure [36, 37]. Although EhADH112 lacks the proline-rich C-terminal tract that harbors the majority of protein-binding sites linking ALIX to various functions [7, 22], instead, this protein has a target cell adherence domain, which binds to a 97 kDa protein in epithelial cells [38]. Besides EhADH112, the *E. histolytica* genome predicts two *EhAdh112*-related genes encoding the

EhADH112-like1 (898 amino acids) and EhADH112-like2 (919 amino acids) proteins [7], both displaying a putative Bro1 domain at their N-terminus (Figure 1(a)). However, the existence of these proteins has not yet been confirmed in trophozoites.

Our current predictions for EhADH112 tertiary structure resulted in protein overlapping to ALIX (Figure 1(b)). Models determined the boomerang or “banana”-shaped spatial conformation for the N-terminal EhADH112 Bro1 domain, mostly made of α-helices forming a solenoid, with helices 6 through 11 arranged in a tetratricopeptide repeat-like structure [19], and a central core arranged in two extended three-helix bundles forming elongated arms that fold back into a “V” (Figure 1(b)). Arms conformation suggests that the “V” domain may act as a hinge, changing in response to ligand binding, as described for ESCRT and viral proteins interaction with ALIX [18]. Apparently, EhADH112 conserves the two hydrophobic patches [19] required for ALIX or BRO1 endosomal membrane targeting and association, via direct binding to ESCRT-III CHMP4 or Vps32 subunits, respectively (Figures 1(b) and 1(c)), or Src-tyrosine kinase docking. Since the conserved interaction of ALIX or BRO1 with ESCRT-III is necessary for membrane inward budding and MVB biogenesis during protein sorting and trafficking [39], it is possible that EhADH112 could associate to putative *E. histolytica* ESCRT-III components via its Bro1 domain.

**3.2. Generation of Trophozoites Overexpressing the Bro1 Recombinant Polypeptide.** To initiate the characterization of the EhADH112 Bro1 domain, trophozoites of clone A (HM1:IMSS) were transfected with the pNeoBro1FLAG plasmid (Figure 1(d)) driving the expression of the recombinant Bro1 polypeptide and generating the ANeoBro1 population. The presence and expression of plasmids in trophozoites was confirmed by RT-PCR amplification of the *Neo<sup>R</sup>* gene. *Neo<sup>R</sup>* was amplified from ANeo (transfected with empty pNeo) and ANeoBro1 trophozoites (Figure 1(e), lane 3), whereas a transcript corresponding to the *Bro1FLAG* fragment, was only detected in the ANeoBro1 population (Figure 1(e), lane 4), as expected. No amplification was detected in the absence of reverse-transcriptase in reaction mixtures or using total RNA from wild type clone A trophozoites (Figure 1(e), lanes 1 and 2).

**3.3. ANeoBro1 Trophozoites Localize the Exogenous Bro1 Recombinant Polypeptide in Cytoplasmic Compartments.** As part of the EhCPADH complex, an *E. histolytica* surface heterodimer involved in target cell adherence, phagocytosis, and destruction, EhADH112 is located at trophozoite plasma membrane and cytoplasmic vacuoles [6]. To determine the location of the Bro1 polypeptide overexpressed by ANeoBro1 trophozoites and to distinguish it from the Bro1 domain present in endogenous EhADH112, immunofluorescence experiments were carried out using polyclonal antibodies against the FLAG tag (pαFLAG) and monoclonal antibodies (mαEhADH112) against the EhADH112 carboxy terminus adherence epitope (444–601 amino acids). ANeo

Protein	Structure	Function
ALIX ( <i>Hs</i> )		Cell adherence, vacuolization, apoptosis, virus budding, and MVB sorting
Rim20 ( <i>Sc</i> )		pH-dependent signaling
BRO1 ( <i>Sc</i> )		MVB sorting
EhADH112-like1 ( <i>Eh</i> )		Unknown function
EhADH112-like2 ( <i>Eh</i> )		Unknown function
EhADH112 ( <i>Eh</i> )		Target cell adherence and phagocytosis

(a)

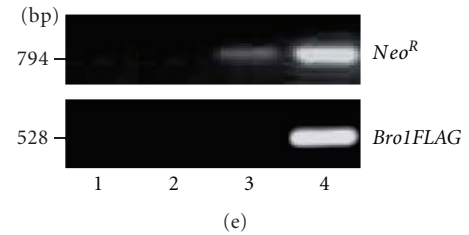
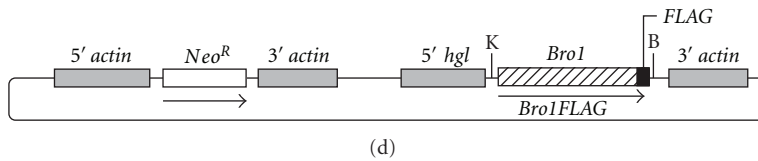
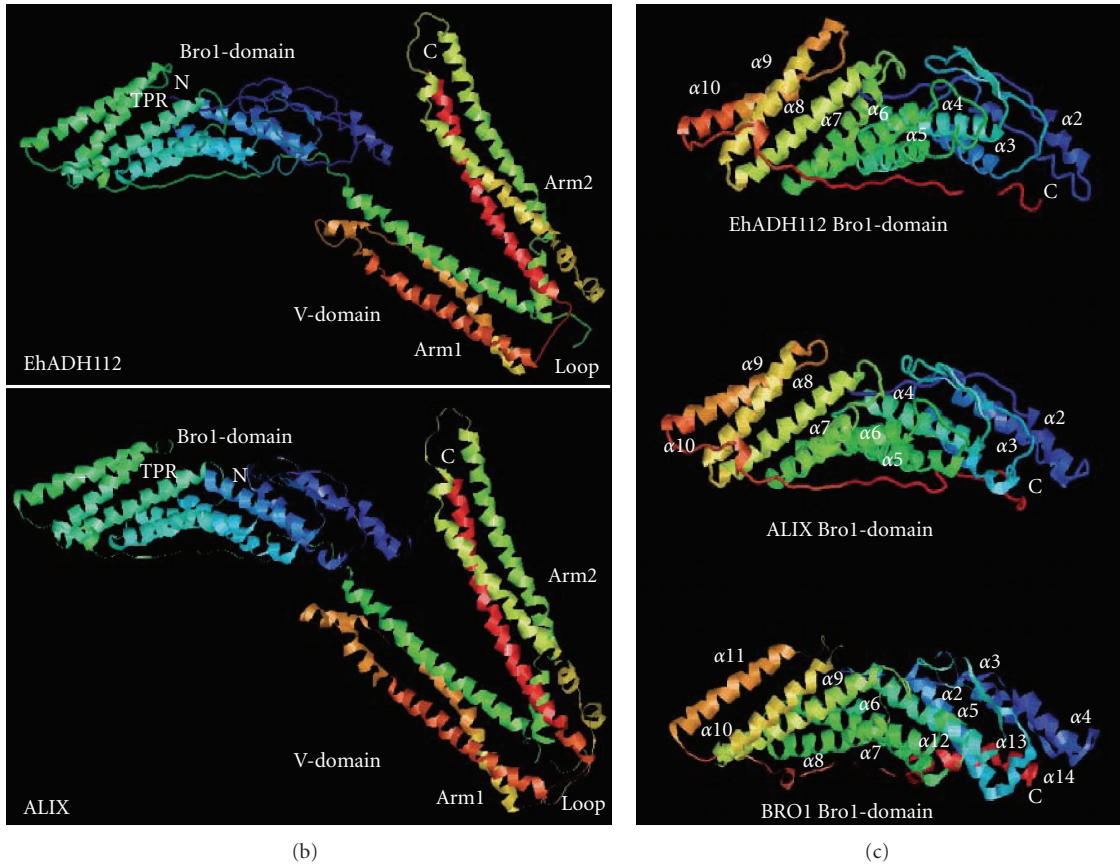


FIGURE 1: Structural features of EhADH112 and generation of ANeoBro1 trophozoites. (a) Structural features of representative Bro1 domain-containing proteins and EhADH112- and EhADH112-like proteins: Bro1 domain (squares containing diagonal lines), coiled coil regions (ellipses), proline-rich tracts (white squares), and adherence region (gray square). *Hs*: *Homo sapiens*; *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Eh*: *Entamoeba histolytica*. Numbers: amino acid number of each protein. (b-c) Spatial conformation of EhADH112 and its Bro1 domain. (b) Ribbon representation for predicted EhADH112 tertiary and human ALIX crystallized structures and (c) Bro1 domains from EhADH112, ALIX and yeast BRO1 proteins. N: amino terminus. C: carboxy terminus. TPR: tetratricopeptide repeat. (d) Schematic depiction of the pNeoBro1FLAG plasmid. K: *KpnI* restriction site. B: *BamHI* restriction site. (e) Transcripts obtained by RT-PCR assays using oligonucleotides for the *Neo<sup>R</sup>* gene or *Bro1FLAG* sequence and cDNAs synthesized from nontransfected clones A (lane 2), ANeo (lane 3), and ANeoBro1 (lane 4). Lane 1 corresponds to the reaction mixture without reverse transcriptase, using total RNA from ANeoBro1.



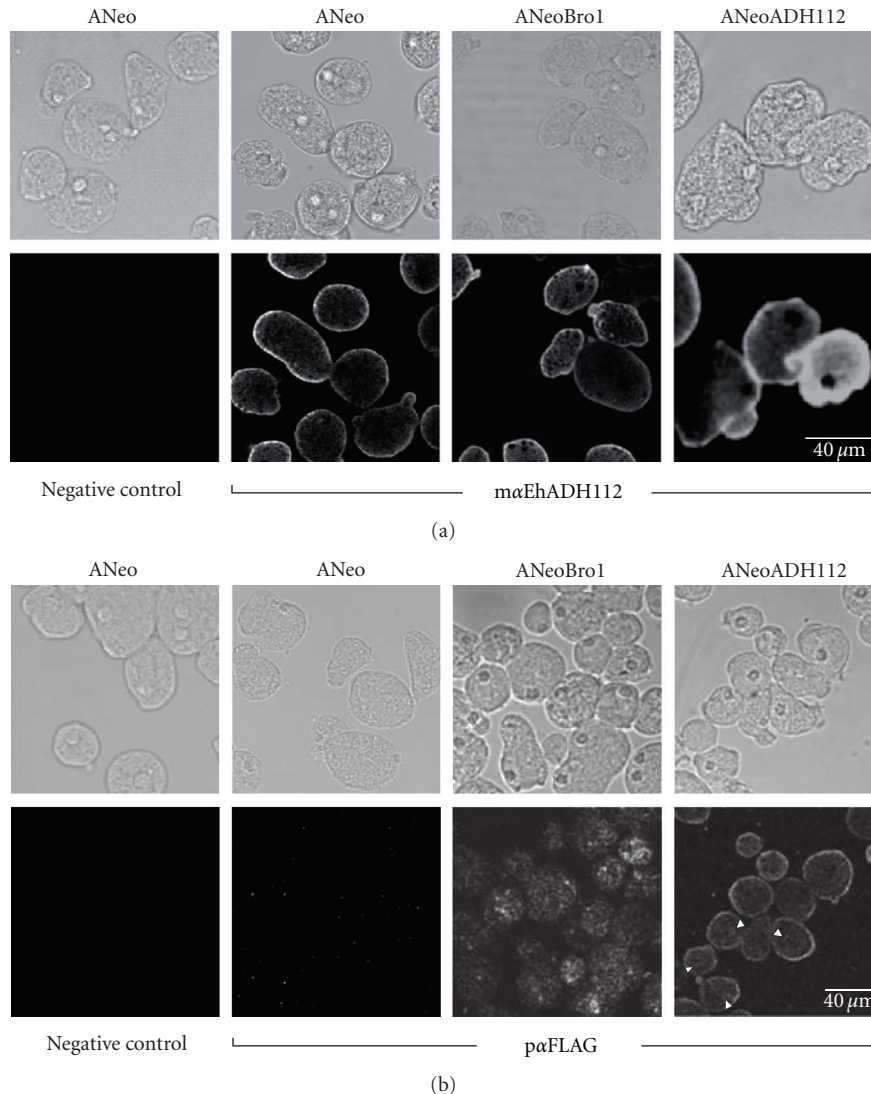


FIGURE 2: Cellular location of EhADH112 and the Bro1 recombinant polypeptide in transfected trophozoites. Confocal microscopy images of permeabilized ANeo, ANeoBro1, or ANeoADH112 trophozoites incubated with (a) mαEhADH112 or (b) pαFLAG antibodies. Negative controls correspond to trophozoite preparations only incubated with secondary antibodies. *Top*: phase contrast images. *Bottom*: corresponding confocal sections. Arrowheads: small cytoplasmic vesicles.

trophozoites, as well as a trophozoite population named ANeoADH112 that overexpresses the EhADH112 full length protein fused to a FLAG tag (EhADH112-FLAG), were used here as additional controls [7].

By confocal microscopy, mαEhADH112 antibodies revealed the presence of EhADH112 at the plasma membrane of permeabilized ANeo, ANeoBro1, and ANeoADH112 trophozoites (Figure 2(a)), although fluorescence was higher in ANeoADH112 population, since these trophozoites express both, endogenous EhADH112 and exogenous EhADH112-FLAG.

As expected, pαFLAG antibodies gave no reaction with ANeo trophozoites (Figure 2(b)), but traced FLAG-tagged Bro1 as punctuated structures and patches of different sizes in the cytoplasm of ANeoBro1 trophozoites. Interestingly, no

signals were detected at plasma membrane (Figure 2(b)), suggesting that the EhADH112 carboxy end, absent in the exogenous Bro1 recombinant polypeptide, could be participating in EhADH112 targeting to the trophozoite surface. Since EhADH112-FLAG appeared at the plasma membrane (Figure 2(b)) and some cytoplasmic vacuoles (Figure 2(b), arrowheads) of ANeoADH112 trophozoites, in a similar pattern to the one exhibited by endogenous EhADH112 in all parasite populations analyzed (Figure 2(a)), we rule out that the FLAG tag could be causing the defective targeting of recombinant Bro1 to the membrane. Negative results were likewise obtained with nontransfected or transfected trophozoites treated only with secondary antibodies. Here, we show results obtained by assaying ANeo trophozoites (Figures 2(a) and 2(b)).

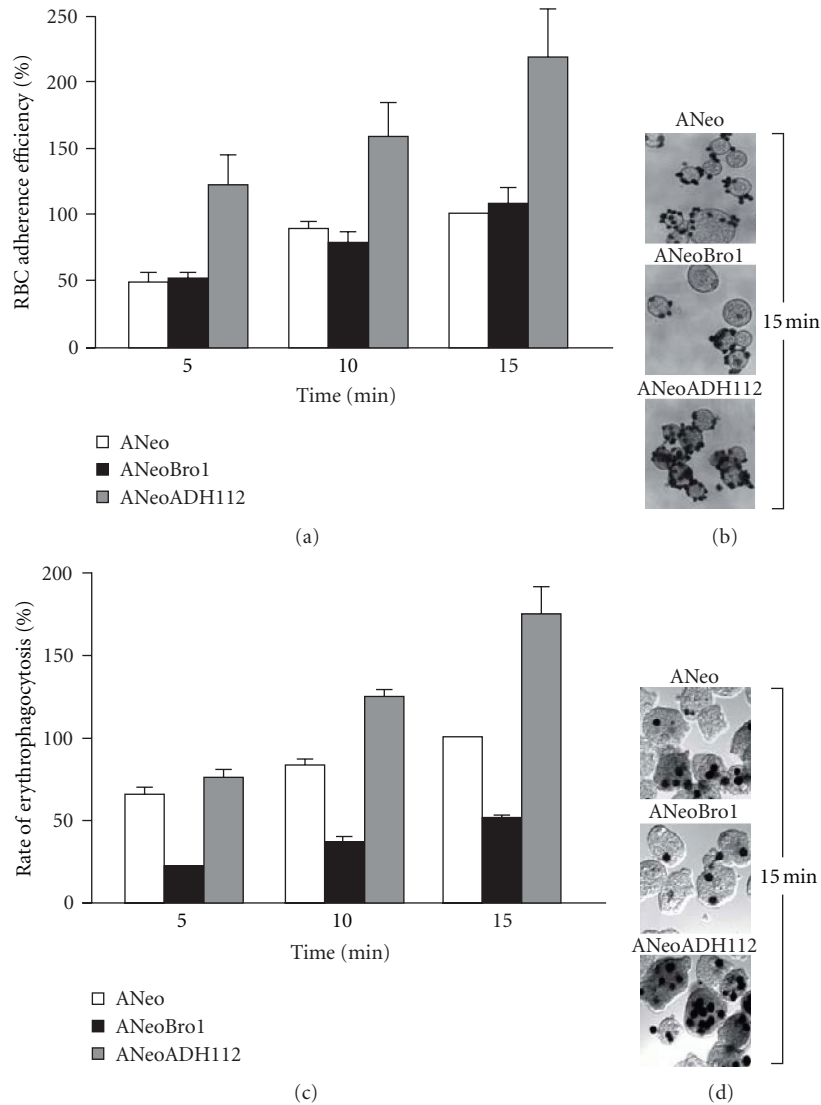


FIGURE 3: RBC adherence efficiency and rates of erythrophagocytosis exhibited by ANeo, ANeoBro1, and ANeoADH112 trophozoites. (a-b) Trophozoites were incubated with RBC (1:100) at 4°C for adherence and (c-d) at 37°C for phagocytosis, for different times. RBC were contrasted with DAB and counted in 100 randomly selected trophozoites under the light microscope to obtain the mean of RBC adhered or ingested by trophozoite. Bars represent the mean  $\pm$  standard error of at least three independent experiments performed by duplicate.

From these experiments, we can conclude that the Bro1 recombinant polypeptide expressed by ANeoBro1 trophozoites is located at a different site than EhADH112, and that transfection procedures or expression of FLAG-tagged proteins did not affect the location of endogenous EhADH112 in trophozoites.

**3.4. Expression of the Exogenous Bro1 Recombinant Polypeptide by ANeoBro1 Trophozoites Diminishes Erythrophagocytosis but Not Target Cell Adherence.** EhADH112 has been previously characterized by the properties conferred by its C-terminus for target cell primary contact, internalization, and phagocytosis [6, 38]. To further understand the Bro1 domain contributions to EhADH112 functions in trophozoites, we carried out RBC adherence and erythrophagocytosis assays. Adherence efficiency and erythrophagocytosis rates exhibited

by ANeo trophozoites at 15 min were taken as 100% in all experiments. Again, as an additional control we used ANeoADH112 trophozoites.

After 15 min of RBC incubation at 4°C, ANeo and ANeoBro1 trophozoites adhered a mean of  $5.7 \pm 3$  and  $6.6 \pm 2$  RBC per trophozoite, respectively (Figures 3(a) and 3(b)), meanwhile at 10 and 5 min they adhered  $4.78 \pm 1$  and  $4.56 \pm 2$ , and  $2.73 \pm 2$  and  $2.8 \pm 2$  RBC per trophozoite, respectively. In contrast, ANeoADH112 showed an increased avidity to attach RBC, by adhering above twice more RBC than ANeo and ANeoBro1 at 15, 10, and 5 min ( $12.5 \pm 2$ ,  $8.7 \pm 2$  and  $7 \pm 2$  RBC per trophozoite, respectively) (Figures 3(a) and 3(b)). These results indicate that exogenous expression of the Bro1 recombinant polypeptide did not affect the adherence function of trophozoites and suggest

that the EhADH112 N-terminus may not be promoting target cell binding.

Interestingly, noteworthy differences were found in assays determining phagocytosis activity of transfected trophozoites. ANeo trophozoites ingested  $14.3 \pm 2$  RBC per parasite at 15 min,  $11.6 \pm 2$  RBC at 10 min and  $9.4 \pm 2$  RBC at 5 min (Figure 3(c)), whereas ANeoBro1 trophozoites only ingested  $7.1 \pm 2$ ,  $5 \pm 2$  and  $2.8 \pm 2$  RBC per trophozoite at 15, 10 and 5 min, respectively (Figures 3(c) and 3(d)). As previously reported [7], ANeoADH112 trophozoites exhibited augmented phagocytosis rates, by ingesting 76% more RBC than ANeo trophozoites at 15 min of erythrophagocytosis (Figures 3(c) and 3(d)), and 40% and 10% more, at 10 and 5 min, respectively (Figure 3(c)). These latter experiments indicate that overexpression of Bro1 results in a dominant negative effect on phagocytosis. We hypothesized that this phenomenon may be due to recruitment and association of proteins probably involved in target cell internalization and phagocytosis by the truncated EhADH112 protein instead of the endogenous one, thus producing a competition for protein binding sites and reducing trophozoites rates of ingestion, despite efficient primary cell contact. Otherwise, the Bro1 recombinant polypeptide *per se*, could be producing a conformational change in EhADH112 or preventing EhADH112 accessibility for the interaction with its counterparts, therefore causing a functional impairment.

Transfection procedures did not modify EhADH112 location and function, since ANeo trophozoites displayed similar results to the ones presented by nontransfected clone A trophozoites (data not shown).

**3.5. The Bro1 Recombinant Polypeptide Exhibits a Different Cellular Location to Endogenous EhADH112 during Phagocytosis.** Previous work using TEM and immunofluorescence experiments determined that the EhADH112 C-terminus mediates target cell adherence but also contributes to phagocytosis activity of *E. histolytica* trophozoites [6, 38]. The diminished phagocytosis rates exhibited by ANeoBro1 trophozoites led us to precise the location of EhADH112 and the overexpressed Bro1 polypeptide after 5 min of erythrophagocytosis.

Through confocal microscopy, and in agreement to preceding findings, EhADH112 was detected at plasma membrane, target cell contact sites, membrane extensions, and phagosomes of nontransfected clone A trophozoites (data not shown). A similar location was determined for EhADH112 in ANeo trophozoites (data not shown), which adhere to and phagocyte RBC in the same way than wild-type trophozoites do. Regarding ANeoBro1 trophozoites (Figure 4(a)), we observed EhADH112 at the trophozoite plasma membrane, cytoplasmic vacuoles and phagosomes (Figure 4(a), top). Besides, small phagosome-neighbouring vesicles that may correspond to endosomes or lysosomes were detected (Figure 4(a), asterisks). Otherwise, the Bro1 recombinant polypeptide was found in cytoplasmic punctuated and vesicular structures and, significantly, it was accumulated in vacuolar compartments (Figure 4(a), arrows) that did not overlap to RBC location (Figure 4(a)). Images

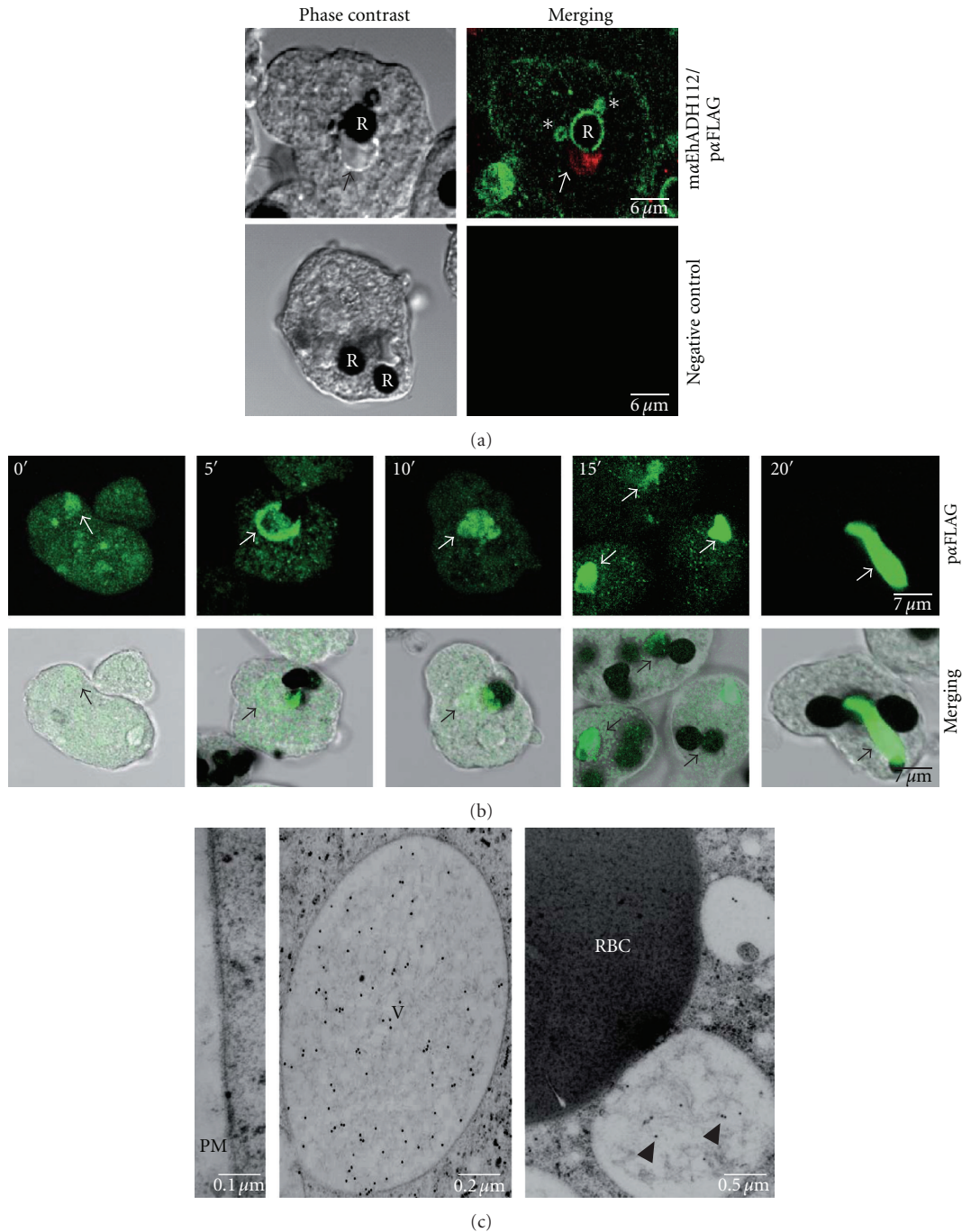
also evidenced that exogenous Bro1 did not reach trophozoites plasma membrane at early stages of phagocytosis and was absent in RBC-containing phagosomes. The different location of EhADH112 and recombinant Bro1 in trophozoites under basal culture conditions, even during phagocytosis, together with the impairment of ANeoBro1 erythrophagocytosis rates and the presence of aggregates containing exogenous Bro1, suggest that this polypeptide could be interfering with the function of trophozoite proteins present at the plasma membrane, probably participating in membrane remodeling and RBC internalization into phagosomes. Control experiments, omitting primary antibodies gave no signals in trophozoites (Figure 4(a), bottom).

### 3.6. Exogenous Bro1 Accumulates in Aberrant Compartments at Late Stages of Phagocytosis.

It has been previously shown that endogenous EhADH112 protein changes its location within trophozoites during RBC phagocytosis. After target cell contact, this adhesin is translocated from the trophozoite plasma membrane to the phagocytic vacuoles. As the ingestion process advances, EhADH112 is found in RBC and after 30 min, it comes back to the plasma membrane [6]. To elucidate whether exogenous Bro1 localizes at some point to the plasma membrane or to phagosomes and to better understand its fate along the erythrophagocytosis process, we followed this recombinant polypeptide in ANeoBro1 trophozoites at different times of RBC ingestion. Immediately after RBC interaction (0 min), exogenous Bro1 appeared in randomly distributed cytoplasmic vesicles and patches of distinct sizes and morphologies (Figure 4(b)). As RBC ingestion progressed (5 min), the exogenous Bro1 recombinant polypeptide accumulated in a ring-like structure surrounding RBC-containing compartments probably corresponding to phagosomes or phagolysosomes (Figure 4(b)). This Bro1-enriched large structure achieved a closer proximity to RBC at 10 min of phagocytosis, although no RBC overlapping was observed (Figure 4(b)). At late phagocytosis stages (15 and 20 min), the Bro1 recombinant polypeptide appeared in huge tubular structures (Figure 4(b)). In yeast, deletion or inactivation of several Vps factors, which assemble into the ESCRT machinery during protein sorting and trafficking through endosomal compartments, induces the formation of enlarged vacuolated and tubulated organelles that fail to mature into MVB [40, 41]. Hence, the large vacuoles observed in ANeoBro1 trophozoites may correspond to aberrant endosomal compartments where the exogenous Bro1 polypeptide is stuck, affecting the dynamics of RBC internalization from the membrane to the phagosomes. Work in progress in our laboratory, using specific biochemical markers, will allow us to determine the identity of these structures.

Since immunoelectron microscopy is a key technique to place macromolecular functions within a cellular context, we addressed the ultrastructural location of exogenous Bro1 in ANeoBro1 trophozoites under basal culture conditions and at 15 min of erythrophagocytosis. For these experiments we used mouse monoclonal antibodies against the FLAG tag (m $\alpha$ FLAG), which resulted to be more sensitive for specific





**FIGURE 4:** Differential location of endogenous EhADH112 and the Bro1 recombinant polypeptide in ANeoBro1 trophozoites during phagocytosis. (a) Cellular immunolocalization of endogenous EhADH112 and exogenous Bro1 in ANeoBro1 trophozoites after RBC ingestion. Trophozoites were incubated with RBC for 5 min and permeabilized. *Top:* after RBC contrasting with DAB, EhADH112 was detected by mαEhADH112 antibodies and FITC-labeled anti-mouse secondary antibodies. The FLAG-tagged Bro1 recombinant polypeptide was detected by pαFLAG antibodies and TRITC-labeled anti-rabbit secondary antibodies. *Bottom:* trophozoites incubated with FITC-labeled anti-mouse IgM and TRITC-labeled anti-rabbit IgG secondary antibodies. Preparations were examined through laser confocal microscopy. R: RBC. Arrows: recombinant Bro1 containing vacuoles. Asterisks: EhADH112 present in endosomal or lysosomal-like compartments. (b) Immunolocalization of exogenous Bro1 in ANeoBro1 trophozoites at different times of erythrophagocytosis. Trophozoites were incubated with fresh RBC and treated as described above. The Bro1 recombinant polypeptide was detected by pαFLAG and FITC-labeled anti-rabbit secondary antibodies. Preparations were examined through a laser confocal microscope. *Top:* confocal sections. *Bottom:* merging of phase contrast images and laser confocal corresponding sections. Arrows: vesicles and large vacuoles containing exogenous Bro1. (c) Ultrastructural location of exogenous Bro1 in ANeoBro1 trophozoites after RBC ingestion. Ultrathin sections of ANeoBro1 trophozoites were processed for immunogold labeling and TEM as described above. The Bro1 recombinant polypeptide was detected by mαFLAG antibodies and gold-labeled secondary antibodies. *Left:* plasma membrane (PM). *Middle:* a huge vacuole. *Right:* vacuoles in the proximity of RBC after 15 min phagocytosis. V: vacuole. Arrowheads: Bro1 gold-labeled particles.

recognition of the FLAG-tagged Bro1 recombinant polypeptide than the  $\alpha$ FLAG ones.

In agreement with the immunofluorescence results showed here (Figures 2, 4(a) and 4(b)),  $m\alpha$ FLAG antibodies did not reveal any signal at the plasma membrane of ANeo-Bro1 trophozoites in culture (data not shown), and neither at 15 min of RBC ingestion (Figure 4(c), left panel). Numerous gold particles associated to fibrillar material were observed within huge vesicles (Figure 4(c), middle panel) that might correspond to the large vacuoles detected in Figures 4(a) and 4(b). Moreover,  $m\alpha$ FLAG antibodies recognized some vesicles close to RBC (Figure 4(c), right panel), confirming that recombinant Bro1 remains in vacuolar compartments of different sizes, but not in RBC or phagosomes (Figure 4(c), right panel). Taken together, our immunolocation results revealed that under culture conditions, exogenous Bro1 is profusely distributed in different-sized cytoplasmic vesicles of ANeoBro1 trophozoites. Similarly, at initial steps of target cell contact, the Bro1 recombinant polypeptide remains in the cytoplasm of ANeoBro1 trophozoites, which preserve their ability to attach to target cells, but significantly decreased their phagocytosis rates. Location of exogenous Bro1 in small structures that gradually come together to transform into exaggerated vacuolar compartments at late stages of phagocytosis suggests that at these sites, recombinant Bro1 could also be retaining proteins involved in RBC internalization, targeting, and phagocytosis, some of them even affecting the function of EhADH112, or that this huge protein complexes may block the recycling of proteins back to the trophozoite membrane, where tentatively they would contribute to the membrane remodeling and protein assembly processes required for phagosome formation.

**3.7. EhADH112 Localizes in Structures Resembling MVB in ANeoBro1 Trophozoites.** According to our immunofluorescence assays, the location of endogenous EhADH112 at the plasma membrane of ANeoBro1 trophozoites was not affected by the overexpression of recombinant Bro1 under basal conditions. In fact, this resulted in RBC adherence efficiencies similar to that displayed by wild-type and ANeo trophozoites. Since EhADH112 was also found in cytoplasmic vacuoles that could differ or not from that in which recombinant Bro1 accumulated, we assessed the ultrastructural location of EhADH112 in ANeoBro1 trophozoites by immunogold labeling experiments, using polyclonal rabbit antibodies against EhADH112 ( $\alpha$ EhADH112) (Figure 5), which gave a better reactivity on frozen ultrathin sections than  $m\alpha$ EhADH112 ones. Of note,  $\alpha$ EhADH112 antibodies do not recognize the EhADH112-like protein sequences previously reported by our group, since Western blot assays specifically detect the band corresponding to the predicted molecular weight of EhADH112 (data not shown).

Through TEM,  $\alpha$ EhADH112 antibodies revealed EhADH112 at the plasma membrane of both, ANeo (data not shown) and ANeoBro1 trophozoites (Figure 5(b)). Gold labeling was also observed at external and internal faces of vesicle membranes and inside vesicles, frequently associated to fibrillar and membranous material (Figures 5(c)–5(e)).

Interestingly, EhADH112 was abundant within large vacuoles containing several tubular and vesicular structures. Huge organelles, containing intraluminal vesicles of different sizes and shapes, the majority of them immunolabeled, appeared in many trophozoites (Figure 5(c)). By their morphology, these compartments may correspond to MVB, which showed a high similarity to the ones described in mammals by Denzer et al. [42]. We also detected numerous whitish EhADH112-carrying vesicles outside electrodense structures with lysosome appearance, which also exhibited EhADH112 signals (Figure 5(d)). These lysosome-like structures presented a delimiting double membrane labeled with EhADH112 (Figures 5(d) and 5(e)). Strikingly, several vacuolar structures, one contained inside the other, which suppose membrane inward budding of vesicles (Figure 5(e), arrows), bordered lysosome-like organelles and carried EhADH112. Recurrent and profuse docking of EhADH112 to the membrane of different-sized vesicles, suggest its possible participation in protein sorting along endosomal compartments and vesicle fusion processes (Figures 5(d) and 5(e)).

**3.8. EhADH112 Appeared on RBC and Phagosomes during Phagocytosis.** At the beginning of erythrophagocytosis, trophozoite membrane proteins make contact with RBC. Immediately, not yet well-understood signaling processes occur, allowing the recruitment of molecules with different roles in the uptake and digestion of target cells. In this paper, our immunofluorescence experiments evidenced that overexpression of the Bro1 recombinant polypeptide in ANeoBro1 trophozoites did not affect EhADH112 location at target cell contact sites and phagosomes (Figure 4(a)). Further, TEM ultrastructural observations, located EhADH112 near to and at invaginating membranes surrounding RBC in trophozoites of ANeo (data not shown) and ANeoBro1 populations (Figure 4(c)). Inside trophozoites, in the vicinity of delimiting membranes surrounding RBC, several small whitish vesicles were seen (Figure 6(b)), sometimes as if they were being released from huge vesicles. By their appearance [42], these vesicles may correspond to MVB (Figure 6(b), asterisks). As phagocytosis advanced, more abundant gold particles were found on RBC (Figures 6(b) and 6(c)). Furthermore, around phagosomes containing RBC, we observed whitish vesicles in arrangements apparently organized, some of them labeled with gold particles (Figure 6(c)).

Mammalian ALIX and yeast BRO1 are cytoplasmic proteins that associate with endosomal compartments to function in concert with components of the ESCRT machinery during MVB formation [41, 43]. In the endocytic pathway, MVB are formed from early endosomes and then, they fuse to late endosomes or lysosomes [12, 44]. Here, our findings strengthen the role of EhADH112 not only as an adhesin at the trophozoite surface, but also as a protein whose similarity to other Bro1 domain-containing proteins such as ALIX, could assign it an alternative function in endosome, phagosome, and MVB formation. The presence of gold labeling at the surface of small vesicles at the proximity of larger vacuoles could mean that EhADH112 is being



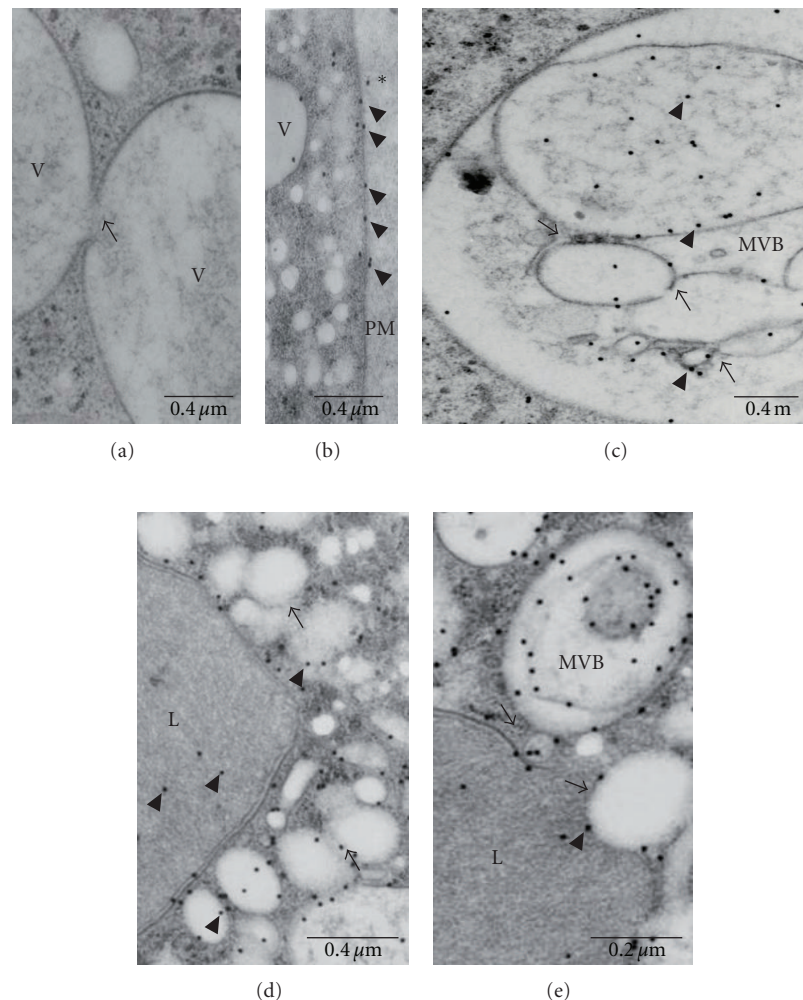


FIGURE 5: Ultrastructural location of EhADH112 in ANeoBro1 trophozoites. Ultrathin sections of ANeo or ANeoBro1 trophozoites were first prepared by cryosubstitution and incubated with  $\alpha$ EhADH112 and gold-labeled secondary antibodies, and then contrasted and analyzed by TEM. (a) ANeoBro1 trophozoites only incubated with gold-labeled secondary antibodies. (b–e) EhADH112-immunogold labeling in (b) plasma membrane (PM), (c) a structure resembling a MVB, (d) a lysosome-like organelle, (e) MVB and vesicles fusing to a lysosome. V: vacuole. MVB: multivesicular bodies. Arrows: vesicular fusion areas. Arrowheads: EhADH112 gold-labeled molecules.

targeted to these sites to perform a putative function in vesicle formation or that it is *per se* a conveyor protein which carries other molecules involved in this process. Moreover, the possibility of EhADH112 participation in vesicle biogenesis implies that it could be translocated from the plasma membrane to the delimiting membranes of internal vesicles. Hence, EhADH112 could be a soluble or insoluble membrane-associated protein, depending on its function and the protein or proteins it binds to.

**3.9. EhADH112 Is Mostly Present in Membrane Subcellular Fractions.** To investigate whether native EhADH112 remains as a soluble or insoluble membrane-associated protein in wild-type trophozoites, we carried out the procedure described by Aley et al. [34] followed by Western blot assays, using rabbit polyclonal antibodies against the last 243 amino acids of EhADH112 ( $\alpha$ EhADH243), which detect the carboxy-terminus of the adhesin.  $\alpha$ EhADH243

antibodies recognized the expected 78 kDa band corresponding to the EhADH112 molecular weight in crude extracts (TP) obtained after disruption of trophozoites incubated with concanavalin A in the presence of protease inhibitors (Figure 7(a), left panel, lane 1). After centrifugation at  $250 \times g$  for 30 min on a mannitol/sucrose gradient, EhADH112 appeared in the supernatant (SN1), which contains vesicles, small membrane fragments, and soluble proteins (Figure 7(a), left panel, lane 2). We also detected a weak band in the pellet (P1), which contains large fragments of plasma membranes and cell debris (Figure 7(a), left panel, lane 3). As a control, we used mouse monoclonal antibodies against actin (*maactin*), which reacted with the corresponding 43 kDa protein in all fractions (Figure 7(a), left panel, lanes 1 to 3).

Then, we ultracentrifuged ( $40\,000 \times g$ ) the SN1 fraction to obtain the supernatant (SN2), where soluble components remain, and the pellet (P2), containing internal vesicles and

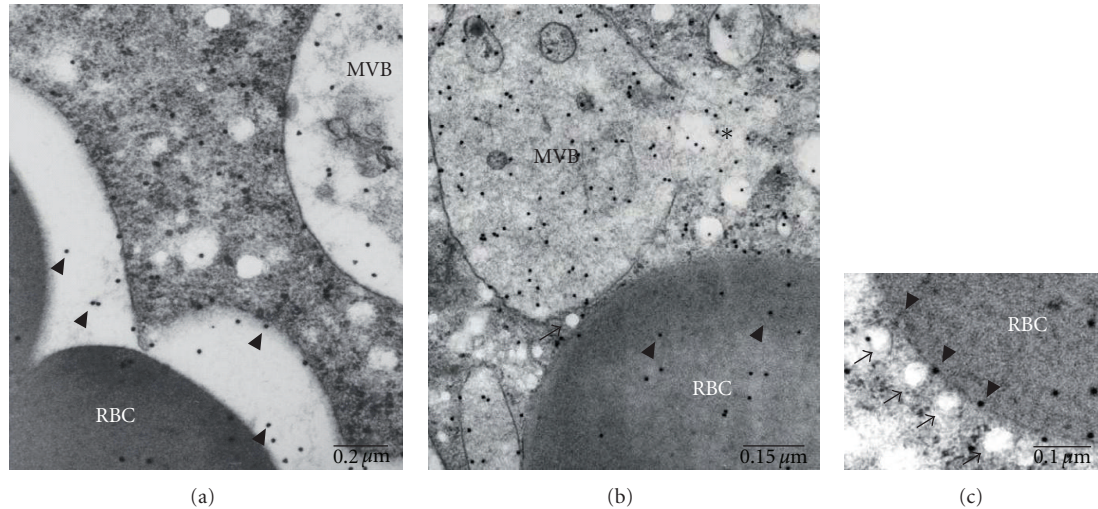


FIGURE 6: Ultrastructural location of EhADH112 in ANeoBro1 trophozoites after RBC ingestion. After 15 min of interaction with RBC, ANeoBro1 trophozoites were processed for immunogold labeling using  $\alpha$ EhADH112 and secondary antibodies, and contrasted and analyzed by TEM as described above. (a) Section from a trophozoite containing a RBC into phagosomal compartments, displaying a cytoplasmic MVB. (b) MVB and RBC neighboring vesicles; (c) RBC surrounded by small vesicles. MVB: multivesicular bodies. RBC: red blood cells. Arrowheads: EhADH112 gold-labeled molecules. Asterisk: disruption of a larger vacuole and release of vesicles.

small membrane fragments. EhADH112 was only found in P2 (Figure 7(a), middle panel, lane 2), suggesting that it could be mostly a membrane-associated protein. Actin was also absent in the SN2 fraction and strongly detected in P2 (Figure 7(a), middle panel, lane 2).

Next, we processed the P1 fraction, that according to Aley et al. [34], contains vesiculated and nonvesiculated plasma membrane fragments. The P1 fraction (Figure 7(a), left panel, lane 3) was homogenized with  $\alpha$ -methyl mannoside and centrifuged at  $250 \times g$  on a sucrose cushion to separate vesiculated (P4) from nonvesiculated membranes and debris (P3). P3 did not react with  $\alpha$ EhADH243 antibodies (Figure 7(a), right panel, lane 1), indicating that EhADH112 is poorly present in nonvesiculated membranes. Then, we concentrated the supernatant (SN3) by ultracentrifugation at  $40\,000 \times g$  to obtain vesiculated membrane fragments (P4).  $\alpha$ EhADH243 antibodies revealed the presence of EhADH112 in P4 (Figure 7(a), right panel, lane 2), thus, confirming that this protein is associated to vesiculated plasma membrane fragments. Meanwhile, actin was localized in P3 and P4, attached to nonvesiculated and vesiculated plasma membranes (Figure 7(a), right panel, lanes 1 and 2).

These data showed the presence of EhADH112 in membrane vesicles, supporting results obtained by microscopy experiments. They also evidence that EhADH112 could be associated to plasma membrane during the active vesicular traffic exhibited by trophozoites, probably inside small vesicles that eventually fuse to plasma membrane.

Most Bro1 domain-containing proteins are cytosolic, and it has been noticed that ALIX is transiently recruited to the plasma membrane to promote membrane fission during budding and release of viral particles, in association to late-acting ESCRT proteins [45]. EhADH112 was originally described as a component of the heterodimeric EhCPADH

complex, present at trophozoite plasma membrane and cytoplasmic vacuoles under culture conditions. Interestingly, during erythrophagocytosis, this complex is found at different locations. First, the protein is found at the trophozoite plasma membrane, particularly, at target cell contact sites. Then, this protein is detected together to internalized erythrocytes, in phagosomes and phagolysosomes. At late stages, the EhCPADH complex is detected again at the trophozoite plasma membrane, thus suggesting protein recycling or even, a putative participation of EhADH112 in membrane remodeling. Additional evidence has consistently confirmed the presence of EhADH112 in both, trophozoite plasma membrane and cytoplasmic vesicles. According to our current subcellular fractioning experiments, EhADH112 is mostly present in membrane fractions. However, as it was shown in Figure 7(a), EhADH112 is also found in fractions containing soluble proteins. Therefore, we cannot discard the possibility that EhADH112 exists in soluble form under particular conditions not yet explored. Since the precise protein location is largely determined by its function in the cell, it must be considered that Bro1 domain containing proteins such as ALIX are ubiquitous in order to serve as scaffold proteins connecting several biological processes. Therefore, additional functions should be investigated for EhADH112 to better understand its subcellular location in trophozoites. Particularly, the presence of EhADH112 in different membrane compartments, strongly supports the hypothesis that EhADH112 could perform a role in the endocytic pathway, although it remains to be established if the previously reported *E. histolytica* ESCRT machinery is indeed participating in this process.

**3.10. EhVps32 Binds to the N-Terminus of EhADH112.** One conserved feature of the majority of Bro1 domain-containing

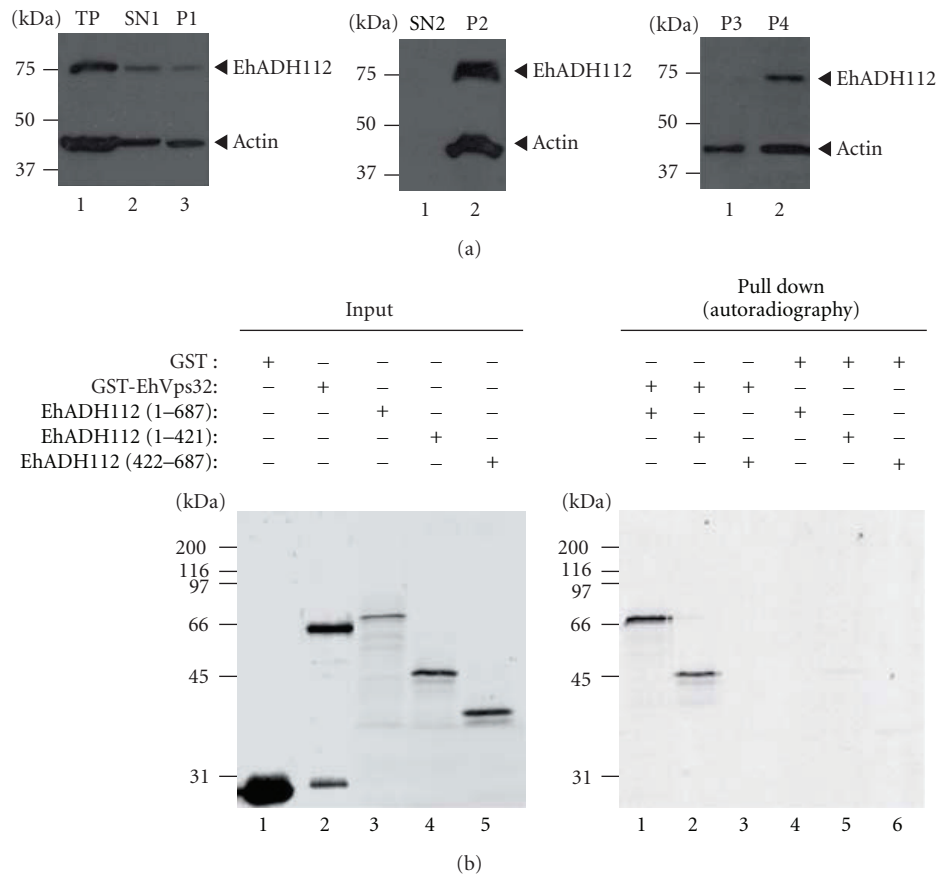


FIGURE 7: EhADH112 major presence in membrane subcellular fractions and EhADH112 interaction with EhVps32. (a) Location of EhADH112 in wild-type trophozoites subcellular fractions. Proteins (50  $\mu$ g) from different fractions of trophozoite extracts were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blot assays were performed using  $\alpha$ EhADH243 and  $\alpha$ actin antibodies and corresponding peroxidase-labeled anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibodies. Membranes were revealed by chemiluminescence. *Left*: SN1 and P1 fractions resulting after total proteins (TP) centrifugation at 250  $\times$ g for 30 min in a mannitol/sucrose gradient. *Middle*: SN2 and P2 fractions resulting after SN1 ultracentrifugation at 40 000  $\times$ g for 60 min. *Right*: P3 and P4 fractions obtained after ultracentrifugation of solubilized P1 at 40 000  $\times$ g for 60 min. (b) Binding of EhADH112 to EhVps32 through the Bro1 domain. GST or GST-EhVps32 proteins were immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with *in vitro* synthesized [ $^{35}$ S]-EhADH112 or [ $^{35}$ S]-EhADH112 derivatives. *Left*: purified GST and GST-EhVps32 fusion proteins or [ $^{35}$ S]-EhADH112 and [ $^{35}$ S]-truncated derivatives (autoradiography, lanes 3, 4 and 5) used for binding experiments (8% of the total reaction mixture). *Right*: pulled-down proteins electrophoresed on 10% SDS-polyacrylamide and detected by autoradiography.

proteins is their ability to bind the ESCRT-III component Vps32 or CHMP4. This interaction allows BRO1 or ALIX targeting to endosomes during MVB formation and virus budding [13, 19]. Here, we investigated whether EhADH112 interacts with an *E. histolytica* protein homologous to yeast Vps32. First, we found in the *E. histolytica* genome database a protein sequence (EhVps32) with an *e*-value of 2.5  $e$ -12, displaying 48% homology and 25% identity to yeast Vps32. According to multiple sequence analysis and Pfam database predictions, EhVps32 contains a Snf7 domain, present in all members of the Snf7 family. Additionally, the predicted EhVps32 secondary structure using the Jpred program, suggested that EhVps32 conserves the characteristic five  $\alpha$ -helices present in the Snf7 family protein. To confirm the predicted interaction between EhADH112 and EhVps32 proteins, pull down experiments were per-

formed. Thus, we expressed a GST-EhVps32 fusion protein in bacteria. GST alone or purified GST-EhVps32 were immobilized on glutathione-sepharose beads (Figure 7(b), left panel, lanes 1 and 2, resp.) and incubated with [ $^{35}$ S]-labeled EhADH112 (Figure 7(b), left panel, lane 3) or [ $^{35}$ S]-EhADH112 (1-421 amino acids) (Figure 7(b), left panel, lane 4) and [ $^{35}$ S]-EhADH112 (422-687 amino acids) derivatives (Figure 7(b), left panel, lane 5), previously synthesized by a coupled transcription-translation system, as described in Section 2.10. GST-EhVps32 beads retained EhADH112 (Figure 7(b), right panel, lane 1), and the EhADH112 (1-421) derivative (Figure 7(b), right panel, lane 2), but not the EhADH112 (422-687 amino acids) polypeptide (Figure 7(b), right panel, lane 3). As expected, GST alone was unable to bind EhADH112 and EhADH112 derivatives (Figure 7(b), right panel, lanes 4 to 6). Proteins present in



pull-down reaction mixtures were Coomassie blue stained as an additional control (data not shown). Together, these results strongly suggest that EhADH112 binds EhVps32 through the Bro1 domain, as it has been reported for other Bro1 domain-containing proteins [19, 20].

Although we do not know yet the identity of other proteins associated to or transported by EhADH112 in live trophozoites, based on these results, we hypothesized that EhADH112 may interact with ESCRT proteins *in vivo*, as it has been reported for ALIX and BRO1 [19, 39, 46, 47]. Interestingly, EhADH112 seems to be a novel member of a subfamily of Bro1 domain-containing proteins present at cellular surface [48] that alternatively could regulate the assembly of proteins at endosomal membranes for MVB biogenesis. Translocation of EhADH112 from the plasma membrane to internal vesicles, endosomes, or phagosomes and back to the surface, could also be related to a scaffold function, as it has been described for its homologues in yeast and mammals [22]. However, protein partnerships in different cellular networks should be addressed further.

#### 4. Conclusions

In this work, we reported for the first time the functional characterization of the N-terminus of EhADH112, an *E. histolytica* Bro1 domain-containing protein involved in parasite virulence. A dramatic decrease of phagocytosis rates displayed by trophozoites overexpressing an EhADH112 Bro1 recombinant polypeptide, together with an exaggerated accumulation of this protein in aberrant compartments, suggested that the Bro1 domain recruits proteins participating in phagocytosis. Moreover, EhADH112 localization at trophozoite plasma membrane, MVB and phagosomes and in both soluble and insoluble subcellular fractions, provided additional support for an alternative role for this protein in the endosomal MVB pathway. This function is conserved among Bro1 domain-containing proteins, which interact with ESCRT components to associate to endosomes. Here, we also showed the *in vitro* association of EhADH112 with an *E. histolytica* protein homologous to the ESCRT-III Vps32 subunit, as a putative hallmark for EhADH112 Bro1 domain function in endosomal protein sorting. Additional efforts should be made to better understand the role of EhADH112 in ESCRT-mediated MVB biogenesis and other functions also assigned to Bro1 domain-containing proteins.

#### Acknowledgments

Authors thank Abigail Betanzos for providing comments on the paper, Silvia Castellanos for  $\alpha$ EhADH243 antibodies and Alfredo Padilla for his assistance in the artwork. This research was mainly supported by the European Community (Phagoamoeba Project) and the National Council for Science and Technology (CONACyT-México). Authors are also grateful for the Spanish CICYT Grant BFU2005-01970 and PFPI studentship supporting O. Vincent and S. Herranz, respectively.

#### References

- [1] S. L. Stanley Jr., "Amoebiasis," *The Lancet*, vol. 361, no. 9362, pp. 1025–1034, 2003.
- [2] R. C. Laughlin and L. A. Temesvari, "Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 7, no. 13, pp. 1–19, 2005.
- [3] E. Orozco, G. Guarneros, A. Martínez-Palomo, and T. Sánchez, "*Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 158, no. 5, pp. 1511–1521, 1983.
- [4] M. A. Rodríguez and E. Orozco, "Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 154, no. 1, pp. 27–32, 1986.
- [5] P. F. P. Pimenta, L. S. Diamond, and D. Mirelman, "*Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: differences in their cell surfaces and in the bacteria-containing vacuoles," *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 49, no. 3, pp. 209–219, 2002.
- [6] G. García-Rivera, M. A. Rodríguez, R. Ocadiz et al., "*Entamoeba histolytica*: a novel cysteine protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein," *Molecular Microbiology*, vol. 33, no. 3, pp. 556–568, 1999.
- [7] C. Bañuelos, G. García-Rivera, I. López-Reyes, and E. Orozco, "Functional characterization of EhADH112: an *Entamoeba histolytica* Bro1 domain-containing protein," *Experimental Parasitology*, vol. 110, no. 3, pp. 292–297, 2005.
- [8] P. Vito, L. Pellegrini, C. Guiet, and L. D'Adamio, "Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked gene ALG-2 in a  $Ca^{2+}$ -dependent reaction," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 3, pp. 1533–1540, 1999.
- [9] M. Missotten, A. Nichols, K. Rieger, and R. Sadoul, "Alix, a novel mouse protein undergoing calcium-dependent interaction with the apoptosis-linked-gene 2 (ALG-2) protein," *Cell Death and Differentiation*, vol. 6, no. 2, pp. 124–129, 1999.
- [10] M. H. H. Schmidt, D. Hoeller, J. Yu et al., "Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 20, pp. 8981–8993, 2004.
- [11] M. H. H. Schmidt, I. Dikic, and O. Bögler, "Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 5, pp. 3414–3425, 2005.
- [12] D. J. Katzmann, G. Odorizzi, and S. D. Emr, "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 12, pp. 893–905, 2002.
- [13] K. Katoh, H. Shibata, H. Suzuki et al., "The ALG-2-interacting protein Alix associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 40, pp. 39104–39113, 2003.
- [14] H. Matsuo, J. Chevallier, N. Mayran et al., "Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization," *Science*, vol. 303, no. 5657, pp. 531–534, 2004.
- [15] S. Pan, R. Wang, X. Zhou et al., "Extracellular Alix regulates integrin-mediated cell adhesions and extracellular matrix assembly," *EMBO Journal*, vol. 27, no. 15, pp. 2077–2090, 2008.
- [16] A. Cabezas, K. G. Bache, A. Brech, and H. Stenmark, "Alix regulates cortical actin and the spatial distribution of endosomes," *Journal of Cell Science*, vol. 118, no. 12, pp. 2625–2635, 2005.

- [17] S. Pan, R. Wang, X. Zhou et al., "Involvement of the conserved adaptor protein Alix in actin cytoskeleton assembly," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 45, pp. 34640–34650, 2006.
- [18] X. Zhou, J. Si, J. Corvera, G. E. Gallick, and J. Kuang, "Decoding the intrinsic mechanism that prohibits ALIX interaction with ESCRT and viral proteins," *Biochemical Journal*, vol. 432, no. 3, pp. 525–534, 2010.
- [19] J. Kim, S. Sitaraman, A. Hierro, B. M. Beach, G. Odorizzi, and J. H. Hurley, "Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain," *Developmental Cell*, vol. 8, no. 6, pp. 937–947, 2005.
- [20] R. D. Fisher, H. Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W. I. Sundquist, and C. P. Hill, "Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding," *Cell*, vol. 128, no. 5, pp. 841–852, 2007.
- [21] R. E. DeJournett, R. Kobayashi, S. Pan et al., "Phosphorylation of the proline-rich domain of Xp95 modulates Xp95 interaction with partner proteins," *Biochemical Journal*, vol. 401, no. 2, pp. 521–531, 2007.
- [22] G. Odorizzi, "The multiple personalities of Alix," *Journal of Cell Science*, vol. 119, no. 15, pp. 3025–3032, 2006.
- [23] J. H. Rothman, I. Howald, and T. H. Stevens, "Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*," *EMBO Journal*, vol. 8, no. 7, pp. 2057–2065, 1989.
- [24] M. E. Nickas and M. P. Yaffe, "BRO1, a novel gene that interacts with components of the Pkc1p-mitogen-activated protein kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16, no. 6, pp. 2585–2593, 1996.
- [25] P. I. Hanson, S. Shim, and S. A. Merrill, "Cell biology of the ESCRT machinery," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 21, no. 4, pp. 568–574, 2009.
- [26] I. Roxrud, H. Stenmark, and L. Malerød, "ESCRT & Co," *Biology of the Cell*, vol. 102, no. 5, pp. 293–318, 2010.
- [27] I. López-Reyes, G. García-Rivera, C. Bañuelos et al., "Detection of the endosomal sorting complex required for transport in *Entamoeba histolytica* and characterization of the EhVps4 protein," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 890674, 2010.
- [28] M. Okada, C. D. Huston, M. Oue et al., "Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 145, no. 2, pp. 171–183, 2006.
- [29] A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti et al., "The pfam protein families database," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 1, pp. 276–280, 2002.
- [30] L. S. Diamond, D. R. Harlow, and C. C. Cunnick, "A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 72, no. 4, pp. 431–432, 1978.
- [31] T. P. Hopp and K. R. Woods, "Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 78, no. 6 I, pp. 3824–3828, 1981.
- [32] L. Hamann, R. Nickel, and E. Tannich, "Transfection and continuous expression of heterologous genes in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 19, pp. 8975–8979, 1995.
- [33] G. García-Rivera, T. Sánchez, E. Orozco, and G. Guarneros, "Isolation of *Entamoeba histolytica* clones deficient in adhesion to human erythrocytes," *Archivos de Investigacion Medica*, vol. 13, no. 3, pp. 129–136, 1982.
- [34] S. B. Aley, W. A. Scott, and Z. A. Cohn, "Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 152, no. 2, pp. 391–404, 1980.
- [35] O. Vincent, L. Rainbow, J. Tilburn, H. N. Arst, and M. A. Peñalva, "YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, no. 5, pp. 1647–1655, 2003.
- [36] W. Xu, F. J. Smith Jr., R. Subaran, and A. P. Mitchell, "Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 15, no. 12, pp. 5528–5537, 2004.
- [37] F. Ichioka, R. Kobayashi, K. Katoh, H. Shibata, and M. Maki, "Brox, a novel farnesylated Bro1 domain-containing protein that associates with charged multivesicular body protein 4 (CHMP4)," *FEBS Journal*, vol. 275, no. 4, pp. 682–692, 2008.
- [38] C. Martínez-López, E. Orozco, T. Sánchez, R. M. García-Pérez, F. Hernández-Hernández, and M. A. Rodríguez, "The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* trophozoites," *Cellular Microbiology*, vol. 6, no. 4, pp. 367–376, 2004.
- [39] M. Babst, "A protein's final ESCRT," *Traffic*, vol. 6, no. 1, pp. 2–9, 2005.
- [40] N. Bishop and P. Woodman, "ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 227–239, 2000.
- [41] N. Luhtala and G. Odorizzi, "Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes," *Journal of Cell Biology*, vol. 166, no. 5, pp. 717–729, 2004.
- [42] K. Denzer, M. J. Kleijmeer, H. F. G. Heijnen, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze, "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device," *Journal of Cell Science*, vol. 113, no. 19, pp. 3365–3374, 2000.
- [43] G. Odorizzi, D. J. Katzmann, M. Babst, A. Audhya, and S. D. Emr, "Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Cell Science*, vol. 116, no. 10, pp. 1893–1903, 2003.
- [44] J. Gruenberg and H. Stenmark, "The biogenesis of multivesicular endosomes," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, no. 4, pp. 317–323, 2004.
- [45] U. K. Von Schwedler, M. Stuchell, B. Müller et al., "The protein network of HIV budding," *Cell*, vol. 114, no. 6, pp. 701–713, 2003.
- [46] J. H. Boysen and A. P. Mitchell, "Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17, no. 3, pp. 1344–1353, 2006.
- [47] J. McCullough, R. D. Fisher, F. G. Whitby, W. I. Sundquist, and C. P. Hill, "ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 22, pp. 7687–7691, 2008.
- [48] T. Irie, N. Nagata, T. Yoshida, and T. Sakaguchi, "Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles," *Virology*, vol. 371, no. 1, pp. 108–120, 2008.