

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Mecanismos de reconocimiento y control de tráfico endosomal por el complejo retrómero

Miguel Romano Moreno

2018

Agradecimientos

Además del agradecimiento general a las instituciones (Gobierno Vasco y CIC bioGUNE) que han permitido la realización de esta tesis, me gustaría agradecer especialmente a las personas que han colaborado en su desarrollo.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis, Aitor Hierro, por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y sobretodo, por hacerme madurar como persona. En segundo lugar, pero no menos importante, tengo que destacar el papel de Adriana Rojas, ya que no sólo su apoyo profesional ha sido imprescindible para la realización de esta tesis, sino que también ha sido mi compañera, confidente y amiga tanto en los buenos como en los malos momentos.

El papel de María Lucas, codirectora de esta tesis, y durante gran parte de ella “mi posdoct”, también ha sido fundamental ya que me ha puesto todo mucho más fácil. Muchísimas gracias por compartir tu experiencia conmigo. De verdad que ha sido y es todo un placer escucharte.

También me gustaría agradecer a todo el grupo RX3, en especial a Ander Vidaurrezaga, sin cuyas manos no habiéramos podido llegar a tiempo, pero también a Sole, Carlos, Lutxi, Elsa y Alberto aunque, sintiéndolo mucho, ya no forme parte de nuestro grupo. El todo es mayor que la suma de las partes.

También me gustaría destacar a los componentes del grupo RX1, especialmente a Paula e Iker, quienes han sido unos excelentes compañeros de viaje.

Finalmente, tengo que agradecer a Amaia, y por supuesto a mis padres, José Miguel y Evangelina, y mi hermana, Eva, por darme su apoyo incondicional en todo momento. Sin vosotros esto no tendría sentido.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
1. Introducción y objetivos	1
1.1. Tráfico vesicular.....	1
1.1.1. Formación de la vesícula.....	3
1.1.2. Motricidad de la vesícula	6
1.1.3. Amarre de la vesícula al compartimento diana	8
1.1.4. Acoplamiento y fusión	9
1.2. Retrómero y tráfico vesicular.....	10
1.2.1. Estructura del retrómero	11
1.2.2. Reclutamiento del retrómero a los endosomas	15
1.2.3. Proteínas accesorias del retrómero	15
1.2.4. Retrómero y enfermedades.....	17
1.2.5. Retrómero y patógenos.....	20
1.3. Legionella pneumophila	20
1.3.1. Replicación intracelular de <i>Legionella pneumophila</i>	23
1.3.2. Efectores de Legionella pneumophila.....	23
1.3.3. RidL (Lpg2311/Ceg28).....	25
1.4. Objetivos.....	27
2. Materiales	31
2.1. Cepas bacterianas.....	31
2.2. Materiales para el cultivo bacteriano.....	31
2.3. DNAs.....	32
2.4. Anticuerpos	32
2.5. Plásmidos.....	32
2.6. Oligonucleótidos	35
2.7. Péptidos	36
2.8. Proteasa TEV	37
2.9. Kits comerciales de soluciones de cristalización	37
3. Métodos.....	41
3.1. Métodos de clonaje	41
3.1.1. Amplificación de DNA mediante PCR.....	41
3.1.2. Electroforesis en gel de agarosa	41
3.1.3. Digestión con enzimas de restricción y defosforilación.....	42
3.1.4. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	42
3.1.5. Gibson assembly.....	42
3.1.6. Transformación por choque térmico.....	43
3.1.7. PCR de comprobación	43
3.1.8. Extracción de DNA.....	44
3.1.9. Secuenciación DNA.....	44
3.2. Caracterización de las proteínas.....	44
3.2.1. Determinación de los parámetros físico-químicos.....	44
3.2.2. Predicción de estructura secundaria.....	44
3.2.3. Determinación de la concentración de proteína	45
3.2.4. Determinación de la solubilidad de los péptidos	45
3.2.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida	45
3.3. Producción de las proteínas recombinantes	46

3.3.1. Expresión proteínas nativas.....	46
3.3.2. Expresión proteínas derivatizadas con selenio	46
3.3.3. Purificación proteínas.....	47
3.3.4. Formación de complejos proteicos	47
3.3.5. Ensayos “pull-down”.....	48
3.3.6. Ensayos de competición.....	48
3.4. Análisis estructural mediante cristalografía de rayos X.....	49
3.4.1. Teoría de la difracción de rayos X.....	49
3.4.2. Cristalización.....	53
3.4.3. Colecta y procesamiento de los datos de difracción	55
3.4.4. Determinación estructural.....	56
3.4.5. Validación de la estructura	60
3.5. Alineamientos de secuencia.....	61
3.6. Dicroísmo circular.....	61
3.7. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....	62
3.8. Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS)	64
3.9. Cromatografía de exclusión de tamaño con dispersión de luz multiangular (SEC-MALS).....	65
3.10. Técnicas en colaboración	66
3.10.1. Transfección y cultivos de células de mamífero	66
3.10.2. Silenciamiento	67
3.10.3. Microscopía de fluorescencia.....	67
3.10.4. Western blot.....	68
4. Resultados	71
4.1. Análisis a nivel atómico y funcional de la interacción entre el efector de <i>Legionella pneumophila</i> , RidL con el retrómero	71
4.1.1. La región N-terminal de RidL participa en la interacción con el retrómero	71
4.1.2. RidL interacciona con el retrómero a través de VPS29	74
4.1.3. Estructura cristalográfica de RidL ₁₋₈₆₆	76
4.1.4. Estructura cristalográfica del complejo formado por RidL ₁₋₂₃₆ y las subunidades del retrómero VPS29 y VPS35C.....	79
4.1.5. Estructura del “hairpin loop” de RidL en complejo con VPS29-VPS35C	82
4.1.6. Las mutaciones en la interfase entre RidL y VPS29 impiden la formación del complejo	86
4.1.7. Ensamblaje del complejo RidL-retrómero en solución	89
4.1.8. RidL permite la formación de dímeros de retrómero	91
4.1.9. RidL se localiza en la membrana de los endosomas a través de la interacción con la subunidad VPS29 del retrómero	92
4.1.10. RidL compete con proteínas accesorias del retrómero por el mismo sitio de unión a VPS29.....	94
4.2. Estudio de la interacción entre el retrómero y la subunidad FAM21 del complejo WASH	104
4.2.1. FAM21 interacciona con VPS29 a través de su extremo C-terminal	104
4.2.2. El motivo R20 de FAM21 interacciona con VPS35	107
4.2.3. El mutante de VPS35 D620N, implicado en la enfermedad de Parkinson, no inhibe la asociación de FAM21-R2021 con el retrómero.....	111

4.3. Análisis estructural de la interacción entre el retrómero y cargos relevantes en la enfermedad de Alzheimer como BACE y APP	113
4.3.1. BACE, APP y DMT1 comparten el mismo sitio de unión al retrómero situado en la interfase de VPS26 y SNX3.....	113
4.3.2. Mecanismo de reconocimiento de BACE y APP	115
5. Discusión.....	121
6. Conclusiones.....	133
7. Bibliografía.....	137
8. Publicaciones.....	151

ABREVIATURAS

A ₂₈₀	Absorbancia a 280nm
AG	Aparato de Golgi
AP	Complejo adaptador
ATP	Adenosin trifosfato
APP	Precursor del péptido amiloide
BACE	β -site APP-cleaving enzyme1
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs
CIAP	Calf intestinal alkaline protease
COG	Conserved oligomeric Golgi
COP	Coat complex protein
DMT1	Divalent metal transporter 1
DTT	Dithiothreitol
EEUU	Estados Unidos
ERGIC	Endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment
Fig.	Figura
GAP	GTPase accelerating proteins
GARP	Golgi-associated retrograde protein
GEF	Guanine nucleotide Exchange factor
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathione S-transferase
HCV	Virus de la hepatitis C
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPV	Virus del papiloma humano
HOPS	Homotypic fusion and vacuole protein sorting
HRP	Horseradish peroxidase
HVS	Herpes virus
Ince	Inclusion membrane protein E
IPTG	Isopropil-B-D-thiogalactopyranosido
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
LB	Luria bertani
LCV	<i>Legionella</i> containing vacuole
MAD	Dispersión anómala de longitud de onda múltiple
MALS	Dispersión de luz multiangular
MIR	Reemplazamiento isomorfo múltiple
NCI	National cancer institute
NCS	Simetría no cristalográfica
NIH	National institute of health
OD	Densidad óptica

PDB	Protein data bank
PEG	Polietilenglicol
PIP3	Fosfatil-inositol-3-fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PX	Phox homology
RidL	Retromer interactor decorating LCVs
SAD	Dispersión anómala de longitud de onda única
SAXS	Dispersión de rayos X de ángulo pequeño
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaño
SeMet	Selenometionina
SIR	Reemplazamiento isomorfo simple
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
SNX	Sorting nexin
SorLA	Sortilin related receptor A
TBC1D5	TBC1 domain family member 5
TEV	<i>Tobacco etch</i> virus
Tip	Tyrosine kinase-interacting protein
Tm	Temperatura de fusión
TRAPP	Transport protein particle
VAMP7	Vesicle associated membrane protein 7
VARP	VPS9-ankyrin-repeat protein
VPS	Vacuolar protein sorting
WASH	Wiskott-Aldrich síndrome protein and scar homolog
YFP	Yellow fluorescent protein
β-ME	Beta mercatoetanol

Introducción y objetivo

1. Introducción y objetivos

1.1. Tráfico vesicular

Los organismos formados por células eucariotas se caracterizan por poseer no sólo un núcleo verdadero sino también un complejo sistema de endomembranas que delimita compartimentos internos denominados orgánulos. Esta compartimentación celular supone una especialización espacial y temporal debida a las funciones específicas que se realizan en el interior de cada uno de los diferentes orgánulos existentes. La separación de los procesos bioquímicos en diferentes compartimentos permite un mayor control como resultado de la sofisticación adoptada por estos, sin embargo, restringe la difusión pasiva de moléculas dentro de la célula. Por tanto, para el intercambio de material entre orgánulos, así como para el mantenimiento de la homeostasis celular, es necesario un sistema de transporte que regule el tráfico de proteínas, lípidos y otros materiales (1). Principalmente, la comunicación entre orgánulos celulares está basada en el uso de pequeñas vesículas como vehículos de transporte (tráfico vesicular) y comprende una compleja red de rutas que conectan los diferentes orgánulos (2). No obstante, determinados compartimentos celulares como mitocondrias, peroxisomas y cloroplastos no participan en el tráfico vesicular clásico. En su lugar, el intercambio de material con otros orgánulos se realiza a través de contactos directos entre membranas u otros mecanismos (3). Estos sistemas de transporte están fuertemente regulados siendo específicamente seleccionadas tanto las moléculas que deben ser transportadas como el compartimento diana al que deben dirigirse. Además, han de permitir que cada orgánulo mantenga su identidad al conservar el equilibrio del conjunto de macromoléculas residentes. La especificidad y direccionalidad del reparto determina la identidad del compartimento aceptor al establecer las funciones que puede llevar a cabo, las cuales dependerán del tipo de moléculas que reciba.

El transporte de vesículas a través de los endosomas es el principal evento de conexión entre los diferentes orgánulos del sistema de endomembranas. Existen dos rutas principales a través de las que se pueden mover las vesículas. Por un

lado la vía biosintética o secretora, encargada del transporte de proteínas, lípidos y carbohidratos a otros orgánulos o al espacio extracelular. Por otro, la ruta endocítica, encargada de incorporar macromoléculas procedentes del exterior celular. En ambos casos, el transporte ocurre mediante la transferencia vectorial de cargos a través de vesículas. Aproximadamente el 30% de la materia celular es transportada por estas vías cuyo equilibrio es fundamental en la homeostasis celular. Las proteínas y lípidos sintetizados inicialmente en el retículo endoplasmático, con la excepción de las proteínas residentes que deben retenerse, tienen como destino las vías biosintéticas y secretoras (4). Los cargos son empaquetados en vesículas y transportados en dirección al aparato de Golgi (AG), en cuyo lado *cis*, tiene lugar la fusión del material proveniente del retículo endoplasmático a través de compartimentos túbulo-vesiculares denominados ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) (5). Una vez en el interior de las cisternas del AG los materiales transportados van progresando a través del orgánulo hasta alcanzar el lado *trans*, donde se empaquetan en nuevas vesículas para su reparto (4). Durante este proceso de maduración ocurren diferentes modificaciones postraduccionales de manera secuencial que permiten a los cargos transportados adquirir su funcionalidad. Además de su papel central en el reparto de material sintetizado en el interior celular, el compartimento *trans*-Golgi es también el encargado del reciclado de moléculas procedentes de orgánulos distales mediante la recepción de vesículas de los endosomas (6, 7). Estas rutas de reciclaje, denominadas tráfico retrógrado, permiten el aprovechamiento de componentes que de otra forma se perderían y por ende aumentaría el gasto de recursos celulares. Por otra parte, la vía endocítica se inicia en la membrana plasmática al formarse las vesículas que engloban las moléculas extracelulares que van a ser incorporadas. Posteriormente, estas vesículas se fusionan con diferentes compartimentos intracelulares entre los que principalmente se encuentran los endosomas (8). La maduración de estos orgánulos a lisosomas permite la degradación de las moléculas incorporadas, así como el reciclaje de componentes de la membrana plasmática que pasarán a formar parte de diferentes compartimentos.

En cada evento de tráfico vesicular se distinguen diferentes etapas comprendidas entre la formación de la vesícula en el compartimento de origen hasta la fusión con el compartimento diana o aceptor de las moléculas que son transportadas. El primero de ellos es la formación de la vesícula en el compartimento de origen (2). A lo largo de este proceso participan diferentes tipos de moléculas que controlan desde la correcta selección e incorporación del cargo hasta la deformación de la membrana que da lugar al surgimiento de la vesícula y posterior escisión del compartimento de origen. A continuación tiene lugar la motricidad de la vesícula hacia el compartimento diana mediante la interacción con proteínas motoras y elementos del citoesqueleto. Finalmente se da el reconocimiento y anclaje entre la vesícula y el compartimento diana, así como la posterior fusión entre membranas. Cada uno de estos estados se consiguen mediante un proceso ordenado de reclutamiento de moléculas. A pesar de los importantes avances conseguidos en las últimas dos décadas, todavía quedan muchos mecanismos moleculares por explorar debido principalmente a la gran diversidad de compartimentos intracelulares existentes así como a la naturaleza dinámica del tráfico vesicular, el cual participa en multitud de procesos fisiológicos diferentes tales como la absorción de nutrientes, la polarización celular, la citoquinesis, la señalización celular, la respuesta inmune y un largo etcétera (8, 9).

1.1.1. Formación de la vesícula

La formación de una vesícula en cualquier compartimento donador ocurre principalmente a través de un proceso controlado para asegurar la correcta incorporación del cargo en su interior (fig. 1). Este proceso está mediado por proteínas de membrana que se ensamblan en el compartimento donador de manera secuencial. El orden en que estas proteínas se unen a la membrana está controlado por pequeñas GTPasas y fosfoinositoles los cuales reclutan y regulan en cada momento el proceso molecular (10). El recubrimiento de la vesícula es también un proceso fundamental en la selección del cargo así como en la posterior formación de la vesícula (11, 12). En este paso participan proteínas de cubierta que son reclutadas mediante proteínas adaptadoras (13). Existen

diferentes tipos de proteínas de cubierta, de las cuales tres han sido estudiadas en mayor detalle: COP I, COP II y clatrina (14). COP I es un complejo proteico formado por un heteroheptámero que participa en el tráfico retrógrado de vesículas desde el AG al retículo endoplasmático, en el transporte intra-Golgi así como en el mantenimiento de la estructura de este orgánulo en mamíferos (15, 16). COP II está implicado en el transporte y selección de proteínas de secreción asegurando que únicamente las proteínas correctamente plegadas y cuyo destino es la salida del retículo endoplasmático sean transportadas al AG (17). Este complejo proteico está formado por la asociación estable de dos heterodímeros, los cuales son requeridos para el recubrimiento de la vesícula (18). La clatrina forma estructuras tridimensionales denominadas trisquelion compuestas por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras, que se asocian formando una caja poliédrica (19). Estas estructuras se unen a la membrana mediante complejos adaptadores (APs) para formar el recubrimiento de clatrina y participar en el reconocimiento del cargo (11). Existen cinco tipos de complejos adaptadores formados por heterotetrámeros: AP1, AP2, AP3, AP4 y AP5 (20). Estos cinco APs se localizan en distintos compartimentos celulares participando de manera específica en las diferentes rutas de transporte. De ellos, únicamente AP1, AP2 y AP3 se asocian a la clatrina para promover su reclutamiento. Las vesículas que presentan este tipo de recubrimiento están implicadas en el transporte de cargos entre la red *trans*-Golgi, así como entre los endosomas y lisosomas, y a la membrana plasmática (19).

Las proteínas de cubierta mencionadas anteriormente han sido las más ampliamente estudiadas, no obstante, recientemente se han descrito nuevas estructuras de recubrimiento como las caveolinas y el retrómero. Las caveolinas son proteínas integrales requeridas para la formación de invaginaciones de la membrana plasmática denominadas caveolas. Se tratan de proteínas multiaciladas de bajo peso molecular (22-24 kDa) presentes en la membrana de las caveolas en forma de oligómeros de entre 100 y 200 repeticiones (21). Están implicadas en procesos endocíticos como la transcitosis de células endoteliales, el transporte entre la membrana y diversos orgánulos, así como en la regulación de la composición lipídica de la membrana plasmática (22). Por último, el

retrómero es la proteína de cubierta descubierta más recientemente. Está compuesto por un heterotrímero, el cual se asocia directa o indirectamente a diferentes tipos de proteínas Sorting Nexins (SNXs). El retrómero específicamente reconoce y agrupa los receptores en subdominios para su reparto a la membrana plasmática, la red *trans*-Golgi así como a diferentes orgánulos distales mediante vesículas tubulares (23).

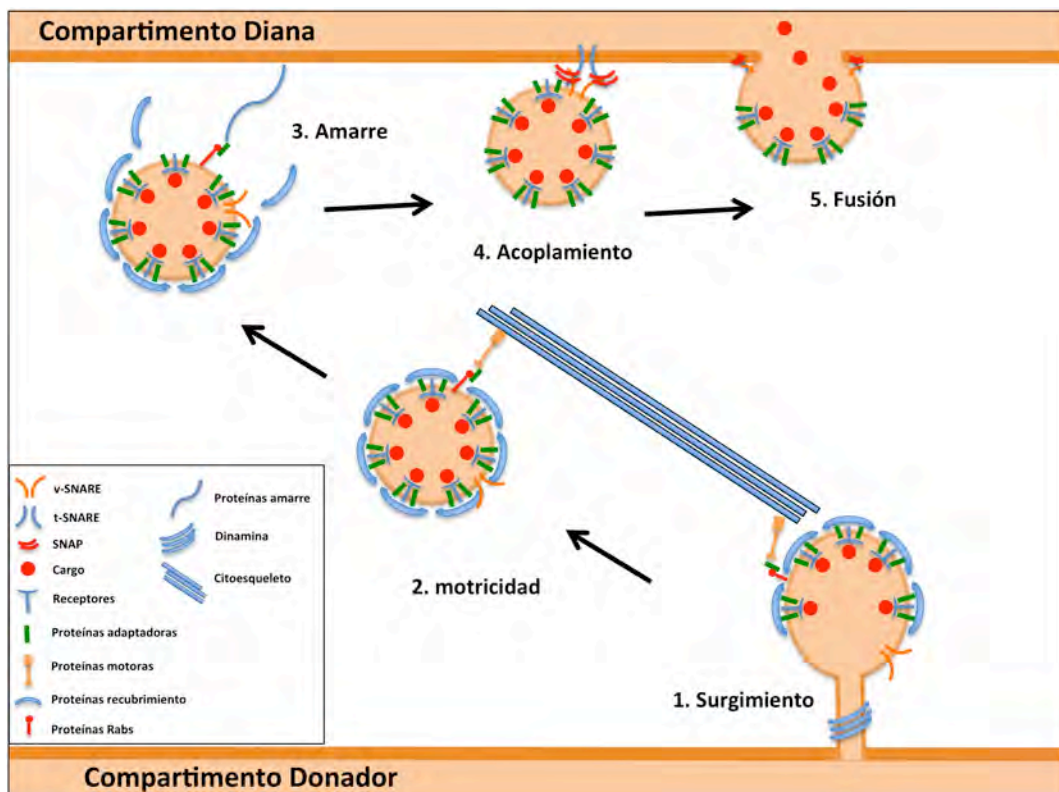


Figura 1. Etapas del tráfico vesicular. (1) Formación y escisión de la vesícula en el compartimento donador mediante el reclutamiento de las proteínas de cubierta y la proteína dinamina. (2) Desplazamiento a través de la interacción con las proteínas motoras y los elementos del citoesqueleto. (3) Reconocimiento inicial del compartimento diana por las proteínas de amarre. (4, 5) Acoplamiento y fusión de la vesícula con el compartimento aceptor de los cargos transportados mediante el modelo de "zippering" de SNAREs.

La eliminación de las proteínas de recubrimiento tras la formación de la vesícula se da mediante la inactivación de las GTPasas que controlan la formación de la cubierta o por el reclutamiento de enzimas de desensamblaje (24). Sin embargo, a pesar de que su separación se inicia de manera simultánea a la escisión de la vesícula, la eliminación total de las proteínas de recubrimiento no se produce

hasta el reconocimiento final por parte del compartimento diana. Es por ello, que se han sugerido nuevas funciones para las proteínas de cubierta además de la selección del cargo y formación de la vesícula. Existen numerosas evidencias de su interacción con proteínas implicadas en diferentes etapas del tráfico vesicular como el desplazamiento, amarre y fusión (25, 26). Las más ampliamente estudiadas han sido las que implican a las proteínas de recubrimiento COP I y COP II con sus respectivos factores de amarre en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (27).

Para terminar de formar la cubierta y provocar la separación de la vesícula, es necesaria la participación de moléculas adicionales. El plegamiento de la membrana se consigue mediante proteínas que poseen secuencias de aminoácidos denominadas dominios BAR, los cuales son capaces de generar curvatura en diferentes momentos de la formación de la vesícula. Además diferentes mecanismos como la inserción y aglomeración de lípidos, así como la inclusión de hélices anfipáticas inducen la curvatura de la membrana (29). Las proteínas motoras actina y miosina también participan en este proceso al generar fuerzas que permiten la protrusión y posterior escisión de la vesícula (30). Finalmente, el proceso de escisión está regulado por fuerzas de tensión y compresión por proteínas del tipo dinamina o mediante fuerzas de fricción y cizalladura a través de proteínas con dominios BAR. Estas proteínas se ensamblan en el cuello de la vesícula estrangulando la comunicación membranosa entre el compartimento diana y la vesícula, y por tanto catalizando su separación (31).

1.1.2. Motricidad de la vesícula

Tras la separación del compartimento de origen la vesícula tiene que desplazarse por el citosol para alcanzar el compartimento diana. El proceso mecánico que se requiere para el movimiento se produce mediante la coordinación entre los elementos del citoesqueleto, las proteínas motoras asociadas a los mismos y la vesícula. Los elementos del citoesqueleto implicados en el transporte vesicular son los microtúbulos y los filamentos de actina. Los microtúbulos están formados

por repeticiones de dímeros de α - y β -tubulina, los cuales se disponen de manera orientada para crear una estructura polarizada (32). Se distribuyen de manera regular adoptando una disposición radial que parte desde el centrosoma. Los filamentos de actina son polímeros polarizados cuya unidad repetida es la proteína actina. Estas estructuras se disponen principalmente en las proximidades de la membrana plasmática ordenándose irregularmente a lo largo del citosol (33). Tanto los microtúbulos como los filamentos de actina necesitan asociarse con las proteínas motoras para realizar sus funciones. Las proteínas motoras convierten la energía química en forma de ATP en trabajo mecánico, permitiéndoles desplazar las vesículas a través de los microtúbulos y los filamentos de actina. Para ello, poseen dos estructuras globulares o cabezas motoras que se unen a los elementos del citoesqueleto e hidrolizan el ATP y una cola flexible encargada de interactuar con los cargos que deben ser transportados. La superfamilia de proteínas motoras miosinas actúa a través de los filamentos de actina arrastrando las vesículas hacia su extremo positivo (34). Por su parte, las kinesinas utilizan los microtúbulos para desplazarse de manera anterógrada en dirección a la periferia de la célula mientras que las dineínas realizan un desplazamiento retrógrado en dirección al núcleo (35). La polarización de los elementos del citoesqueleto y el movimiento selectivo de las proteínas motoras permite el desplazamiento dirigido de las vesículas hacia su compartimento aceptor. El transporte de la vesícula se produce mediante sucesivos movimientos coordinados de unión y desvinculación del dominio motor con los elementos del citoesqueleto, lo que conlleva un consumo energético en forma de ATP (34).

Existen diferentes procesos regulatorios que controlan la interacción y activación de las proteínas motoras, asegurando que el transporte únicamente ocurra después de la correcta formación de la vesícula. La coordinación de la interacción de la vesícula con los elementos del citoesqueleto y las proteínas motoras requeridas para su desplazamiento se da mediante la activación del sitio de unión a la vesícula (31). La activación se produce a través del reclutamiento de proteínas adaptadoras entre las que principalmente se encuentran proteínas de la familia Rab. Los ejemplos mejor estudiados de proteínas Rab implicadas en

el transporte vesicular a lo largo de microtúbulos y filamentos de actina son Rab11, Rab6 y Rab7. Rab11 interacciona con la miosina V para regular la movilidad de las vesículas que van a ser recicladas a la membrana plasmática (36). Rab6 se asocia con kinesinas participando en el tráfico retrógrado entre los endosomas y la red *trans*-Golgi, el transporte intra-Golgi y en el retículo endoplasmático (37). Por último, Rab7 recluta dineínas controlando el desplazamiento de vesículas de los endosomas tardíos a los lisosomas (38).

1.1.3. Amarre de la vesícula al compartimento diana

El primer contacto físico entre la vesícula de transporte y el compartimento diana se denomina amarre. Este reconocimiento inicial es un proceso selectivo con el fin de asegurar la fusión con el compartimento diana adecuado. En esta primera fase participan GTPasas reguladoras de las familias Rho, Rab y Arl y proteínas de amarre que controlan el proceso permitiendo capturar y anclar la vesícula de transporte a la membrana del compartimento aceptor (39). Dentro de las proteínas de amarre existen, por un lado, factores de amarre (coiled-coil) que pueden establecer conexiones de más de 200 nm y por otro lado, complejos de amarre cuyo radio de acción es menor (40). Los factores de amarre se distribuyen de manera específica en los diferentes compartimentos celulares. Entre ellos se encuentran los complejos multiproteicos localizados en el retículo endoplasmático, DSI1 y DSI3, en las diferentes partes del AG, TRAPP (Transport protein Golgi), COG (conserved oligomeric Golgi) y GARP (Golgi-associated Retrograde Protein), los situados en los endosomas y lisosomas, HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) y CORVET, así como los presentes en la membrana plasmática denominados exocistos (41). Además de actuar como simples puentes conectores entre membranas, los factores de amarre participan en el desensamblaje de las proteínas de cubierta (24), así como en el proceso de acercamiento y fusión de la vesícula con el compartimento aceptor (42).

1.1.4. Acoplamiento y fusión

El paso final en la transferencia de cargos a través de vesículas de transporte comprende el acoplamiento y fusión de la vesícula con el compartimento diana. Este proceso supone unir dos membranas separadas en una y conlleva saltar una importante barrera termodinámica debido a la repulsión ejercida por las membranas de ambos compartimentos (42). Para ello se requiere la presencia de proteínas de fusión que disminuyan esta barrera en el momento y lugar apropiado y regulen la composición de lípidos y proteínas de las respectivas bicapas lipídicas (43). La superfamilia de proteínas SNARE juega un papel esencial en el mecanismo de fusión de membranas. Se trata de proteínas, principalmente transmembrana, que comparten el dominio SNARE responsable de la iniciación del proceso de fusión (44). Originariamente, se creía que existía una separación entre los SNAREs del compartimento origen (v-SNARE) y los SNAREs del compartimento diana (t-SNARE) los cuales interactuaban entre sí. Sin embargo, este método de unión entre SNAREs ha demostrado no ser lo suficientemente preciso para describir el mecanismo de interacción entre ellos debido a la formación de complejos. La interacción de dominios SNARE mediante el modelo de “zippering”, el cual conlleva la unión de cuatro SNAREs posicionados en membranas opuestas, es el mecanismo más aceptado para explicar la fuerza mecánica de unión subyacente a la fusión de membranas. La formación de complejos de SNAREs está asociado a diferentes cambios conformacionales y energéticos que permiten un acercamiento mucho mayor de las membranas de ambos compartimentos y el inicio de la fusión. Cuando los SNAREs permanecen de forma monomérica se encuentran desestructurados, mientras que cuando el conjunto apropiado de SNAREs se une, los motivos SNARE forman espontáneamente un empaquetamiento paralelo de las hélices de cada dominio que les confiere una gran estabilidad (45). El núcleo de la interacción está formado principalmente por residuos hidrofílicos, 3 glutaminas y una arginina, que permiten alterar el límite hidrofílico-hidrofóbico e iniciar la fusión de membranas (46). En la etapa final de la fusión de membranas los factores de amarre también desempeñan un papel mecánico crucial. Estos complejos proteicos proporcionan la fuerza de tracción necesaria para la apertura del poro entre membranas precedente a la fusión (47). Además, otros

factores como las proteínas SNAP, la proteína NSF así como los filamentos de actina también participan en determinados estados del proceso de fusión (46).

1.2. Retrómero y tráfico vesicular

Los avances conseguidos en las últimas dos décadas en la investigación del tráfico vesicular han permitido la identificación de importantes componentes de la maquinaria molecular que participa en las diferentes etapas de este proceso. Para ello, el conocimiento de la composición, función y estructura de las diferentes proteínas y orgánulos que componen el sistema de tráfico ha sido fundamental para definir su papel en cada una de las etapas de este proceso. Un ejemplo de ello son los endosomas, los cuales han pasado de ser considerados simplemente el lugar donde proteínas, lípidos y otros componentes celulares son almacenados para su degradación a ser vistos como un núcleo central en el reparto de estos materiales dentro de la célula (48). Estos orgánulos están conectados a la membrana plasmática, la red *trans*-Golgi y otros compartimentos especializados mediante las vías endocíticas y de tráfico retrógrado. Por tanto, el control de la degradación o reutilización de los componentes almacenados en estos orgánulos requiere una compleja maquinaria molecular que permita seleccionarlos y segregarlos a las diferentes rutas a las que están destinados (49).

Los endosomas poseen multitud de proteínas implicadas en el tráfico del material que reciben. Por un lado, en estos orgánulos existen proteínas que participan en la recepción del material que va a ser internalizado. Por otro, poseen determinados complejos de transporte que se encargan del reciclaje de las moléculas cuyo destino no es ser degradadas en su interior. De forma similar al del resto de rutas del tráfico vesicular, la maquinaria molecular presente en los endosomas se encuentra altamente conservada e incluye pequeñas GTPasas de la familia Rab, proteínas de recubrimiento como la clatrina y el retrómero, factores de amarre como HOPS y CORVET y proteínas de fusión como los SNAREs. Una de las proteínas principales en el proceso de reciclaje es el retrómero, el cual controla, mediante la asociación a diferentes efectores, el tráfico de cargos

destinados tanto a la membrana plasmática, la red *trans*-Golgi así como a diferentes orgánulos distales (23).

El complejo proteico que constituye el retrómero fue inicialmente descubierto en levaduras hace dos décadas (50) y desde entonces, el conocimiento sobre su mecanismo de acción, así como la importancia que ha adquirido en el reciclaje y reparto de un cada vez más amplio rango de cargos ha evolucionado exponencialmente. Asimismo, la identificación de numerosos receptores transmembrana cuyo reciclado depende del retrómero ha supuesto su implicación en múltiples procesos fisiológicos y patológicos de gran relevancia como neurodegeneración, desarrollo, cáncer, homeostasis y enfermedades infecciosas. Hasta ahora ha sido bien caracterizado su papel en el reciclaje del receptor de hidrolasas vacuolares (51) y del transportador de hierro de membrana (52) de levaduras. Además, en mamíferos ha sido identificado en el tráfico del receptor de inmunoglobulinas poliméricas (53), del receptor de la transferrina (54), la proteína de transporte Wntless (55), el transportador de cationes divalentes DMT1-II (56) así como de las toxinas Shiga de *E. coli* y del cólera (57). Al igual que otras proteínas de cubierta, como la clatrina, COP I y COP II, el retrómero coordina la selección específica de los cargos que van a ser transportados y la deformación de la membrana en túbulo-vesículas (23). No obstante, a diferencia de las proteínas de cubierta anteriormente mencionadas, el retrómero presenta una cubierta cuya estructura y mecanismo de reconocimiento de receptores no parece mantener una estrecha relación con éstas (56). Es por ello que a pesar de los recientes avances conseguidos, el mecanismo molecular mediante el cual el retrómero específicamente reconoce y agrupa los receptores en subdominios túbulo-vesiculares para su reparto continua siendo desconocido.

1.2.1. Estructura del retrómero

Los diferentes componentes del retrómero han sido identificados en prácticamente todos los organismos eucariotas, lo que pone de manifiesto la alta conservación de este complejo proteico a lo largo de la evolución y su

importancia universal. En levaduras, las proteínas que forman este complejo proteico son VPS26p, VPS29p, VPS35p, como adaptador del cargo, así como las SNXs, VPS5p y VPS17p (58). En mamíferos se han encontrado ortólogos de todos ellos con la excepción de la proteína VPS17p (59). En esta clase, el retrómero está compuesto por la asociación estable de dos subcomplejos. Por un lado, un heterotrímero que actúa como adaptador del cargo formado por la proteína VPS26, de la que existen dos variantes VPS26A y VPS26B, y las proteínas VPS29 y VPS35 (60). Por otro, tres posibles combinaciones de proteínas “sorting Nexins” (SNXs), entre las que se encuentran SNX3, SNX27, SNX1, SNX5 y SNX6. Esta región es la encargada de interactuar con los fosfolípidos de la membrana y deformarla en túbulo-vesículas (61).

Las proteínas SNXs pertenecen a una familia de proteínas cuya característica principal es la presencia de un dominio PX, el cual les permite unirse a la membrana de los endosomas mediante la interacción con fosfatidil inositoles, especialmente fosfatil-inositol-3-fosfato (PIP3) (62). Además de esta característica común, las SNXs pueden contener motivos estructurales adicionales como los dominios BAR, capaces de detectar e inducir la curvatura de la membrana (63), y los dominios PDZ-FERM, responsables de la interacción con diferentes proteínas accesorias (64). En mamíferos, de las 33 SNXs descritas solo 7 se han identificado asociadas de forma directa o indirecta con el retrómero: SNX1, SNX2, SNX3, SNX5, SNX6, SNX12 y SNX27. De ellas, SNX1, SNX2, SNX5 y SNX6 pertenecen a la subfamilia de SNXs que contienen el dominio BAR (63), SNX27 posee la región PDZ-FERM (64) mientras que SNX3 y SNX12 no contienen dominios adicionales (62). En el caso de SNX3, de la que se tienen evidencias estructurales de su arquitectura en combinación con el retrómero, el complejo formado adopta una estructura en forma de T en el cual el extremo N-terminal de la SNX3 y su dominio PX se unen simultáneamente a la región C-terminal de VPS26 y al fragmento N-terminal de VPS35 (56). En este complejo, la región de SNX3 encargada de interactuar con la membrana queda localizada en el extremo opuesto al del dominio responsable de la interacción con VPS26 y VPS35.

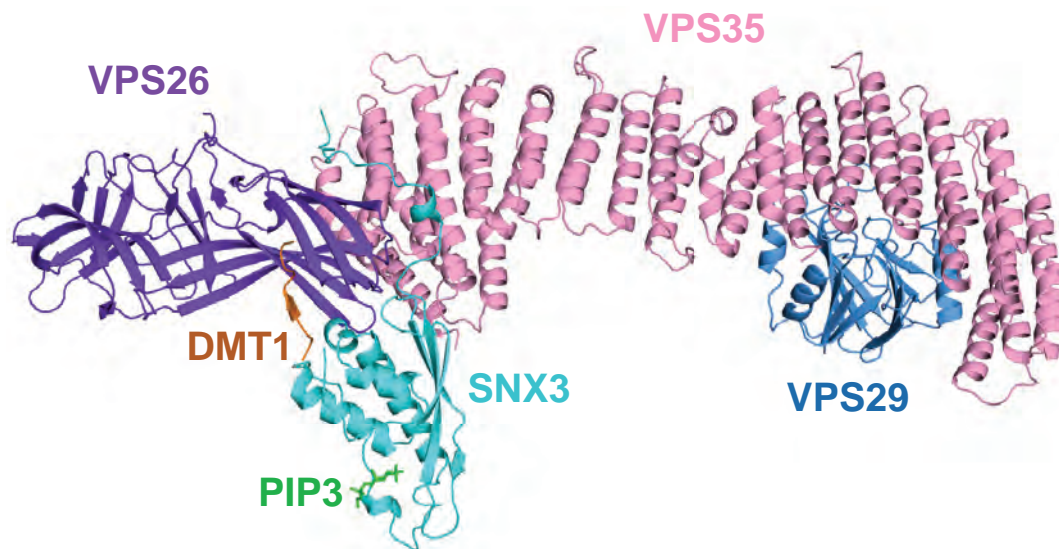


Figura 2. Modelo estructural del retrómero en complejo con SNX3 y DMT1, obtenido de la superposición de las estructuras de VPS29-VPS35C (código PDB: 2R17) y VPS26-VPS35N-SNX3-DMT1 (código PDB: 5F0L) sobre los datos de SAXS (56). El heterotrímero formado por VPS26 (morado), VPS29 (azul) y VPS35 (rosa) adopta una arquitectura modular donde VPS35 se localiza en la sección intermedia mientras que VPS26 y VPS29 se ubican en los extremos opuestos. SNX3 (cian) interactúa a través del extremo N-terminal y el dominio PX con la región C-terminal de VPS26 y el fragmento N-terminal de VPS35. La región de SNX3 encargada de interactuar con el PIP3 (verde) queda localizada en el extremo opuesto.

La resolución estructural mediante cristalografía de rayos X de las subunidades que forman el retrómero ha sido esencial para establecer modelos de este complejo proteico, permitiendo obtener una información más precisa de su función y mecanismo de acción (fig. 2). La proteína VPS35 posee una conformación elongada, dentro de la arquitectura modular del retrómero, adoptando una estructura en forma de solenoide de α -hélices (60). Esta proteína tiene cierta capacidad de flexión y actúa como una plataforma en la sección intermedia del retrómero, a través de la cual se unen las proteínas VPS26 y VPS29 en extremos opuestos (56, 60). VPS26 adquiere un plegamiento en forma de arrestina y se une al extremo N-terminal de VPS35 (65, 66). Además, interactúa con el dominio PDZ de la SNX27 y con el dominio PX de la SNX3, actuando como adaptador del cargo mediante el reconocimiento de diferentes motivos canónicos (56). Por último, la proteína VPS29 adopta una conformación de metalofosfoesterasa y posee dos superficies localizadas en extremos opuestos, formadas por residuos altamente conservados (67, 68). En una de las superficies

se localiza el sitio catalítico incompleto de la proteína VPS29, el cual al interactuar con el extremo C-terminal de VPS35 queda ocluido (60). En el extremo opuesto, donde se encuentra la otra superficie conservada, interaccionan diferentes proteínas accesorias como VARP (69) y TBC1d5 (70) entre otras, las cuales regulan la actividad del retrómero.

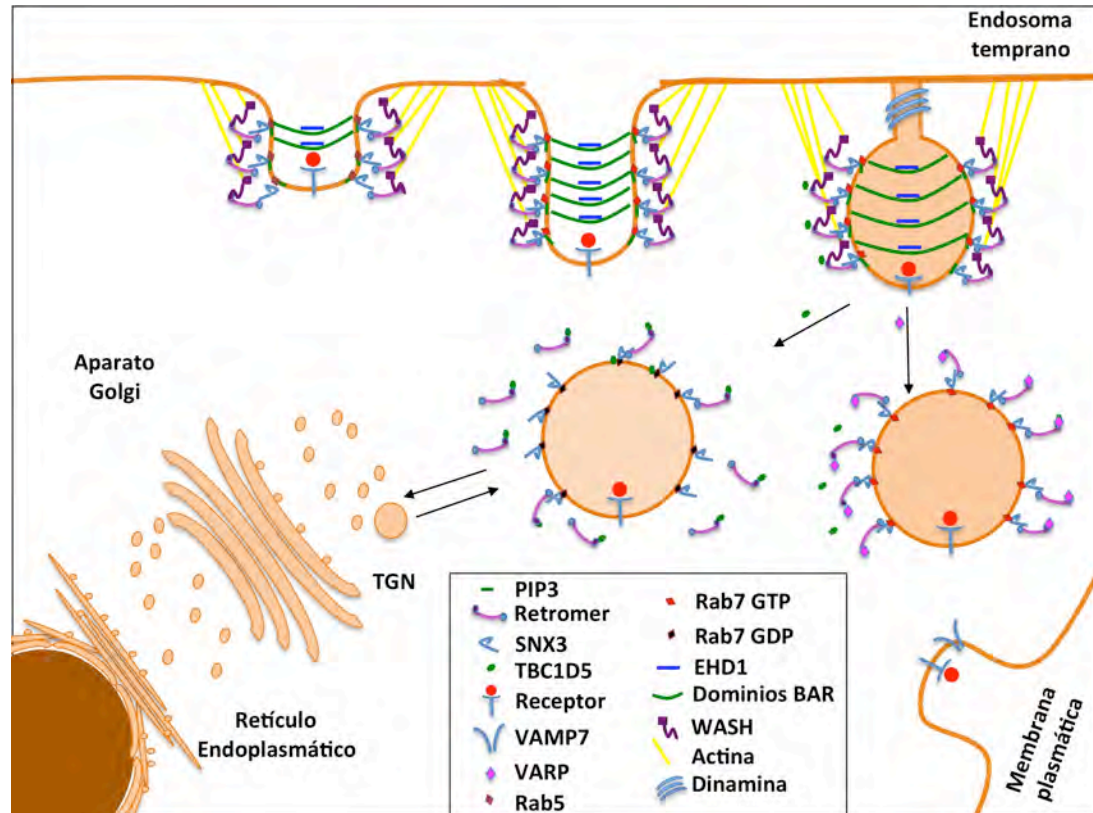


Figura 3. Mecanismo de acción del retrómero y sus proteínas accesorias en el reciclado de receptores. Inicialmente, el dímero de proteínas SNXs requiere del efecto combinado de Rab5 y la unión al fosfatidil inositol 3 fosfato (PIP3) para ser reclutado a la membrana. La asociación del retrómero a los endosomas se logra a través de su interacción con SNX3 y Rab7-GTP (72). Una vez incorporado, el retrómero comienza el surgimiento de la vesícula con la deformación de la membrana llevada a cabo por el dímero de SNXs con dominios BAR (61). EHD1 participa en la estabilización de las túbulos-vesículas (75). El complejo WASH controla la formación de los filamentos de actina que inician la protrusión y posterior escisión de la vesícula ayudado en esta última etapa por proteínas del tipo dinamina o con dominios BAR (77). Formada la vesícula, el retrómero puede ser liberado al citosol mediante la inactivación de Rab7 por TBC1d5 o puede reclutar la proteína VARP y mediar en el tráfico a la membrana plasmática (73, 74).

1.2.2. Reclutamiento del retrómero a los endosomas

Los diferentes subcomplejos que forman el retrómero no son reclutados de manera simultánea a la membrana de los endosomas. Por un lado, se incorpora el dímero de proteínas SNXs y por otro el adaptador del cargo, formado por el heterotrímero de proteínas VPSs (71). Los diferentes componentes del adaptador del cargo pueden ensamblarse en el citosol para formar el trímero y posteriormente ser reclutados a la membrana o unirse individualmente para formar en ella este complejo proteico (23). Debido a que el heterotrímero de proteínas VPSs carece de capacidad intrínseca para unirse a la membrana, requiere de su asociación con el dímero de SNXs y Rab7, así como de la actividad de pequeñas GTPasas como Rab5, para incorporarse a los endosomas e iniciar el reclutamiento del cargo y la deformación de la membrana en túbulo-vesículas (72). Las interacciones descritas son esenciales para el reclutamiento y actividad del retrómero a pesar de la baja afinidad que presentan (56, 72). Por tanto, inicialmente el dímero de proteínas SNXs es reclutado a la membrana mediante el efecto combinado de Rab5 y la unión al fosfatil-inositol-3-fosfato (PIP3). A pesar de que Rab5 no interacciona directamente con el retrómero, su activación promueve el reclutamiento del dímero de proteínas SNXs al favorecer la producción de PIP3 a través de la enzima fosfo-inositol-3-kinasa (72). Este subcomplejo contribuye a la incorporación de las diferentes subunidades del adaptador del cargo mediante la interacción con VPS35 y VPS26 (57), permitiendo la formación completa del retrómero en la membrana de los endosomas. Una vez formado el complejo, se produce la disociación de Rab5 y su reemplazamiento por Rab7, así como el aumento de la producción de PIP3 a través de otras rutas para mantener unido el dímero de SNXs a la membrana (72).

1.2.3. Proteínas accesorias del retrómero

El retrómero, una vez asociado a la membrana de los endosomas, interacciona con diferentes proteínas accesorias para llevar a cabo su función (fig. 3). Debido al dinamismo de los endosomas, los cuales son estructuras móviles que conectan rutas muy diversas y reciben un constante flujo de moléculas que les hace pasar

por diferentes estados de maduración, el retrómero tiene que ser capaz de operar de manera igualmente dinámica para responder ante los cambios que se producen en estos orgánulos y reconocer en cada momento los cargos que deben ser transportados. Para ello, el retrómero puede actuar de manera directa o mediante la interacción con proteínas accesorias, las cuales le permiten controlar no sólo el reconocimiento de cargos, sino también, la deformación de la membrana en túbulo-vesículas (23). Existen numerosas proteínas accesorias entre las que se incluyen, el TBC1d5, VARP, EHD1, y la proteína FAM21 perteneciente al complejo WASH. Todas ellas interaccionan de manera directa con el retrómero para su incorporación a la membrana de los endosomas y regulan su actividad en las diferentes etapas que tienen lugar en el tráfico de cargos presentes en estos orgánulos.

TBC1d5 es una proteína aceleradora de la actividad GTPasa con actividad hidrolítica para Rab7. Esta proteína adaptadora regula negativamente el reclutamiento del retrómero a la membrana de los endosomas mediante el desplazamiento de Rab7, la cual es requerida para la permanencia del trímero de proteínas VPS en los endosomas. Para su asociación a la membrana TBC1d5 requiere de la interacción directa con el retrómero a través de la subunidad VPS29, así como con la región N-terminal de VPS35 (73). Por su parte, VARP participa en el tráfico hacia la membrana plasmática mediante su asociación con el R-SNARE VAMP7 (74). Esta proteína es incorporada a la membrana de los endosomas a través de la interacción con la misma región de VPS29 que TBC1d5 (73). Es por ello, que entre estas dos proteínas accesorias existe una competición a la hora de unirse al retrómero. La asociación de VARP al retrómero inhibe la unión de TBC1d5 impidiendo la liberación al citosol del retrómero e intensificando el reciclaje de cargos hacia la membrana plasmática (66). El papel de la proteína adaptadora EHD1 en el tráfico endosomal no está completamente definido, aunque parece requerirse para la estabilización de los túbulos generados por el dímero de SNXs (75). Por último, FAM21 es la proteína de mayor tamaño de las 5 que forman el complejo WASH. Este complejo proteico controla la formación de los filamentos de actina en los endosomas, los cuales funcionan como plataformas que delimitan micro-regiones de la membrana

donde los cargos serán concentrados para su posterior incorporación en vesículas (76). Así mismo, regula la protrusión y escisión de las vesículas en surgimiento mediante su asociación con la proteína dinamina (77). El reclutamiento del complejo WASH a la membrana de los endosomas se logra principalmente a través de la interacción de FAM21 con el retrómero (78). Para ello, FAM21 está formado por un dominio globular, situado en la región N-terminal, que comprende los 200 primeros aminoácidos seguido por una región desestructurada que posee 21 repeticiones del motivo L-F-acidic₃₋₁₀-L-F. La unión con el retrómero y por tanto su reclutamiento a la membrana se produce principalmente a través de los motivos L-F-acidic₃₋₁₀-L-F, situados en su extremo C-terminal (79). El complejo WASH también puede ser reclutado a los endosomas de manera independiente de la unión con el retrómero. A pesar de que este mecanismo no ha sido claramente definido, podría estar relacionado con la capacidad intrínseca del complejo WASH de unirse a fosfolípidos de la membrana (79).

1.2.4. Retrómero y enfermedades

La importancia del retrómero en el reciclaje y reutilización de numerosos receptores transmembrana, conlleva su implicación en multitud de procesos fisiológicos diferentes. Como consecuencia, no es de extrañar que la disfunción de la actividad del retrómero haya sido relacionada con diferentes procesos patológicos de gran relevancia como enfermedades autoinmunes, desordenes del desarrollo, polarización celular, cáncer, eliminación de células apoptóticas, homeostasis del hierro así como enfermedades neurodegenerativas como alzhéimer, párkinson, síndrome de Down y enfermedades priónicas (80).

La pérdida de función de cualquiera de los componentes que forman el retrómero puede derivar de mutaciones puntuales u otros factores genéticos, produciendo la pérdida de la actividad general de este complejo y por ende promoviendo el desarrollo de enfermedades. Las patologías relacionadas con defectos en el retrómero más estudiadas son los desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (81). Estos

trastornos se caracterizan por una pérdida de memoria o motricidad progresiva con la edad y a pesar de la confluencia de diferentes factores, el papel que desempeña el retrómero en la patogénesis de ambas ha sido claramente identificado como una importante causa en su desarrollo. La enfermedad de Alzheimer se desarrolla como consecuencia de la acumulación de depósitos extracelulares del péptido β -amiloide que provocan la disfunción neuronal. Esta proteína se genera por la proteólisis secuencial del precursor del péptido amiloide (APP) mediante dos secretasas amiloidogénicas denominadas “ β -site APP-cleaving enzyme1” (BACE) y γ -secretasa. De manera independiente el APP puede escindirse a través de la α -secretasa, dando como resultado un péptido soluble cuya degradación puede realizarse con facilidad. La vía amiloidogénica se da principalmente en los endosomas mientras que la proteólisis del APP por la α -secretasa ocurre en la superficie celular. El tráfico vesicular de APP y de las diferentes secretasas, condiciona su localización celular y por tanto, es clave en la producción del péptido β -amiloide. En pacientes de alzhéimer con desarrollo tardío de la enfermedad, los cuales suponen alrededor del 95% de los casos, se ha observado una marcada disminución de los niveles de retrómero en el cortex (82). En esta región del cerebro, especialmente vulnerable a la neurodegeneración, los niveles de expresión de VPS26 y VPS35 disminuyen con la edad alterando el tráfico de los cargos dependientes del retrómero, BACE, SorLA y APP, implicados en la enfermedad de Alzheimer. En modelos animales, se ha observado que la redistribución de estos cargos conlleva la acumulación del APP en los endosomas u otros lugares de degradación amiloidogénica, provocando el aumento de la producción del péptido amiloide y consiguiente progresión de la enfermedad (83).

Por otra parte, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por la acumulación de cuerpos de Lewy formados por los elevados niveles de α -sinucleína no degradada en los endosomas (84). La toxicidad derivada de estos depósitos promueve la degeneración de las neuronas dopaminérgicas causando el progreso de la enfermedad. Este proceso se incrementa por la ausencia o pérdida de función de la subunidad VPS35 del retrómero, debido principalmente a la menor asociación con la maquinaria reguladora y consiguiente alteración del

tráfico de los receptores cuyo reciclado depende del retrómero (85). Numerosas mutaciones en VPS35 han sido relacionadas con la enfermedad de Parkinson (86). La que mayor penetrancia presenta es la mutación D620N, la cual ha sido relacionada con una forma de enfermedad de Parkinson presente en aproximadamente el 1.3% de los casos hereditarios y el 0.3% de los casos esporádicos (87). La implicación de esta mutación en el desarrollo de la enfermedad no está del todo clara aunque se han propuesto diferentes explicaciones como la alteración de la actividad del complejo WASH a través de la interacción de esta subunidad con FAM21 (88), el aumento de la fosforilación de proteínas de la familia Rab mediante la sobreactivación de las quinasas responsables de este proceso (89) o el defecto causado en la homeostasis de ciertos átomos pesados como el cobre, níquel y cadmio (85). Sin embargo, los mecanismos moleculares exactos de la implicación del retrómero en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson son todavía desconocidos debido a la confluencia de múltiples factores en su desarrollo.

El retrómero también participa en la patogénesis de otros desórdenes neurológicos como el síndrome de Down y las enfermedades priónicas. El síndrome de Down, o trisomía del cromosoma 21, está causado por la sobreexpresión de los genes presentes en este cromosoma. Esta enfermedad se manifiesta en un retraso mental debido a la presencia de anomalías dendríticas y sinápticas en el cortex y el hipocampo. Este fenotipo es causado principalmente por la sobreexpresión de miR-155, un micro RNA codificado por el cromosoma 21, el cual regula de manera negativa el factor de transcripción de SNX27, denominado C/EBP β . Como consecuencia, los niveles de expresión de SNX27 se reducen significativamente afectando a la actividad del retrómero en el reciclaje de múltiples receptores entre los que se encuentran los receptores NMDARs y AMPARs, implicados en la transducción de la señal en las neuronas postsinápticas (90). Por último, las enfermedades priónicas se caracterizan por la degeneración esponjiforme de las neuronas como resultado de la acumulación de agregados de priones. Estos depósitos se producen por el metabolismo anómalo de la forma resistente de las proteínas priónicas. El papel del retrómero en estas patologías parece depender de su capacidad para controlar el tráfico de

hidrolasas ácidas a los lisosomas, favoreciendo la degradación de los priones de manera eficiente. La subunidad VPS35 ha sido identificada como un agente protector contra la acumulación de los agregados priónicos en modelos animales (91).

1.2.5. Retrómero y patógenos

Debido a la importancia biológica y alto nivel de conservación del retrómero y sus proteínas accesorias, este complejo proteico es utilizado o manipulado por multitud de patógenos en su beneficio. Existen numerosos ejemplos de virus, bacterias y protozoos capaces de manipular la actividad del retrómero a su favor mediante el uso de proteínas con funciones específicas denominadas efectores. Entre los virus, se incluyen el Herpes virus (HVS) a través de la proteína Tip (92), el virus del papiloma humano (HPV) mediante las proteínas L1 y L2 (93), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) con la glicoproteína de membrana Env (94), el influenzavirus o virus de la gripe a través de la proteína de la matriz M2 (95) o el virus de la hepatitis C (HCV) mediante el uso de la proteína NS5A (96). Adicionalmente, las enterobacterias del género *Shigella* así como numerosos serotipos patogénicos de *Escherichia coli* mediante la liberación de la toxina Shiga (97), la bacteria *Chlamidia trachomatis* mediante la proteína de membrana IncE (98), así como, los géneros *Coxiella*, *Salmonella*, *Sinkania*, *Legionella* y el protozoo *Toxoplasma gondii* (99) son también ejemplos de microorganismos que manipulan o se aprovechan de la actividad del retrómero para modular el sistema endosomal de la célula hospedante o simplemente utilizarlo en su tránsito intracelular. El denominador común en todos ellos es el secuestro o pérdida de función de alguna de las subunidades del retrómero a través de la unión a efectores, los cuales imitan la forma o función de proteínas del hospedador utilizando principalmente mecanismos de mimetismo molecular.

1.3. Legionella pneumophila

Legionella pneumophila es una bacilo aerobio Gram-negativo del género *Legionella*. Su hábitat natural son los ambientes de agua dulce estancada por lo

que puede encontrarse en sistemas naturales como lagos, pantanos y suelos húmedos, así como, en todo tipo de depósitos artificiales como potabilizadoras, instalaciones de suministro y aires acondicionados (100). Su crecimiento se ve favorecido a elevadas temperaturas, con un desarrollo óptimo entre 35°C y 45°C y en presencia de un alto contenido de materia orgánica. Es un patógeno intracelular oportunista por lo que a pesar de que sus hospedadores naturales son protozoos y amebas también es capaz de infectar y replicarse en el interior de macrófagos en los pulmones (101). *Legionella pneumophila* serogrupo1 es la especie del género *Legionella* responsable de la mayoría de las infecciones causadas en humanos (102). Han sido descritos dos tipos de enfermedades provocadas por esta bacteria, la fiebre de Pontiac y la enfermedad del legionario. La fiebre de Pontiac es la forma más leve de infección y sus síntomas son similares a los de un síndrome febril común, el cual está caracterizado por una elevación de la temperatura corporal. La enfermedad del Legionario o Legionelosis es una forma severa de neumonía, potencialmente mortal, que incluye fuertes dolores musculares (103). Esta enfermedad se detectó por primera vez en 1976 a raíz de la aparición de un brote epidémico ocurrido en la convención anual de la Legión americana. La identificación del agente causal de dicha infección supuso el descubrimiento de *Legionella pneumophila*.

Legionella pneumophila puede ser transmitida por vía aérea desde su reservorio inicial hasta el hospedador final donde tiene lugar el proceso infectivo (101). Para ello, la bacteria debe alcanzar una concentración suficiente para causar la infección, en un proceso conocido como amplificación, y pasar al ambiente en estado infectivo mediante la diseminación en aerosoles (100). La tasa real de incidencia varía considerablemente en función del nivel de control y detección utilizado en cada sistema sanitario debido a que en determinadas situaciones no se utilizan sistemas lo suficientemente robustos para su identificación (fig. 4). En Europa se registran aproximadamente 28.000 casos al año (103). Sin embargo, su prevalencia en determinados entornos ha ido incrementando gradualmente como consecuencia del crecimiento de la densidad poblacional y el aumento del número de posibles reservorios (104). La tasa de mortalidad depende de diversos aspectos como la gravedad de la enfermedad, la idoneidad del

tratamiento inicial, así como, diferentes factores relacionados con el huésped. Esta variable oscila entre el 20% y el 30% de los casos aunque en determinados grupos de riesgo, como en sujetos inmunodeprimidos no tratados, la tasa de mortalidad puede llegar al 80%. Actualmente, no existe vacuna por lo que la única alternativa existente para su tratamiento es el uso de antibióticos como quinolonas y macrólidos (103).

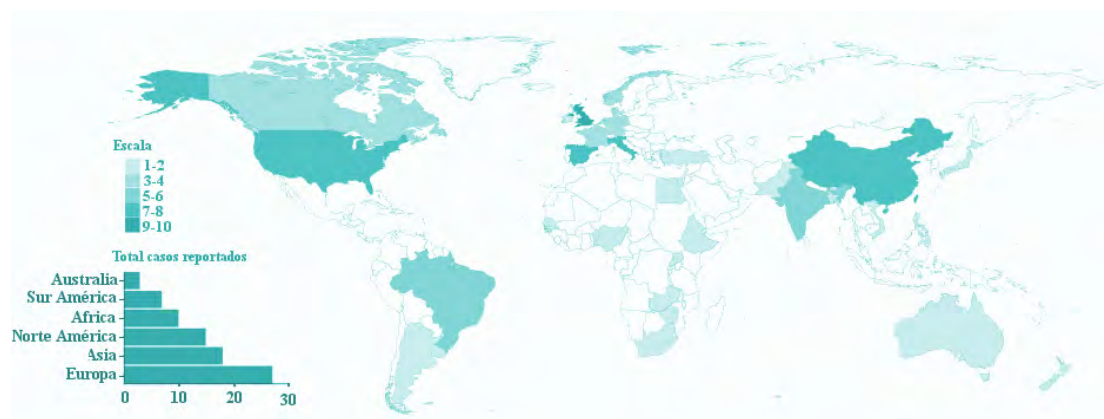


Figura 4. Distribución por países de casos identificados de Legionelosis en el año 2017. La escala de verdes relaciona el número de casos por millón de habitantes. El número total de casos documentados por continente se indica en el gráfico de barras. La tasa real de incidencia varía en función de los sistemas de control y detección utilizados en cada país. Fuente: Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH, National Institute of Health).

Para sobrevivir y dividirse en el interior de la célula hospedante, *Legionella pneumophila* debe ser capaz de evadir los mecanismos de la respuesta inmune y asegurarse el suministro de nutrientes (105). Este proceso lo consigue mediante la manipulación de las funciones de la célula huésped para utilizarlas en su favor. Para ello, *Legionella pneumophila* cuenta con una batería de proteínas específicas denominadas efectores que son translocados al citosol de la célula hospedante (106). El estudio de las distintas estrategias y efectores utilizados por este microorganismo ha permitido comprender no solo muchos de los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria, sino también sobre los propios procesos celulares. Por este motivo, los efectores de *Legionella pneumophila* además de suponer dianas terapéuticas son también herramientas en el estudio de la biología celular.

1.3.1. Replicación intracelular de *Legionella pneumophila*

La infección se da principalmente por inhalación de aerosoles contaminados permitiendo a *Legionella pneumophila* alcanzar los alveolos pulmonares del hospedador. Una vez en el interior de estas cavidades la bacteria es fagocitada por células especializadas del sistema inmune, denominadas macrófagos, donde en lugar de ser destruidas, consiguen sobrevivir y reproducirse (fig. 5, 6). Para ello, *L. pneumophila* es capaz de formar nichos replicativos protegidos, los cuales reciben el nombre de LCV ("*Legionella* containing vacuole") (107). Estas estructuras se forman a partir del fagosoma mediante un proceso de modificación que conlleva el cambio de la composición lipídico-proteica de su membrana, asemejándose a la del Retículo Endoplasmático. Para ello, *L. pneumophila* recluta diferentes componentes de la célula huésped, como ribosomas y mitocondrias, a las proximidades del fagosoma, y promueve el desplazamiento de proteínas presentes en endosomas tardíos y lisosomas por otras específicas de los LCVs (108). De esta forma, *Legionella pneumophila* se enmascara en el interior de la célula hospedante evitando la degradación en la vía lisosomal y por tanto, evadiendo la respuesta inmune innata llevada a cabo por los macrófagos.

1.3.2. Efectores de *Legionella pneumophila*

La habilidad de *Legionella pneumophila* para sobrevivir y reproducirse intracelularmente depende de su capacidad para manipular las funciones de la célula huésped a su favor (105). Para ello, esta bacteria transloca al citosol más de 300 proteínas diferentes, denominadas efectores, las cuales representan aproximadamente el 10% del total de proteínas codificadas por *Legionella pneumophila*. A pesar de su elevado número, existe una gran cantidad de efectores con funciones redundantes que permiten a la bacteria tener diferentes alternativas para su crecimiento (109). El sistema de translocación de efectores depende del sistema de secreción tipo IV Dot/Icm (T4SS) y es indispensable durante todo el ciclo de crecimiento intracelular. Este complejo proteico, formado por aproximadamente 26 proteínas, permite atravesar la doble membrana bacteriana así como la membrana del fagosoma liberando

directamente los efectores al citosol (110). Mediante el control de la transcripción y translocación de efectores, *Legionella pneumophila* es capaz de interferir en numerosos procesos de la célula huésped, entre los que se incluyen, la ruta endocítica (111), la ruta de secreción (112), la maquinaria de ubiquitinación (113), las rutas de muerte celular (114), así como en el metabolismo y señalización de lípidos y proteínas (115, 116). A pesar de que se han logrado progresos significativos en la identificación y comprensión de la función de muchos de estos efectores, la mayor parte de ellos no han sido caracterizados en detalle y su modo de actuación continúa siendo desconocido. La falta de homología estructural y de secuencia con otras proteínas con funciones conocidas es el motivo principal que dificulta esta tarea.

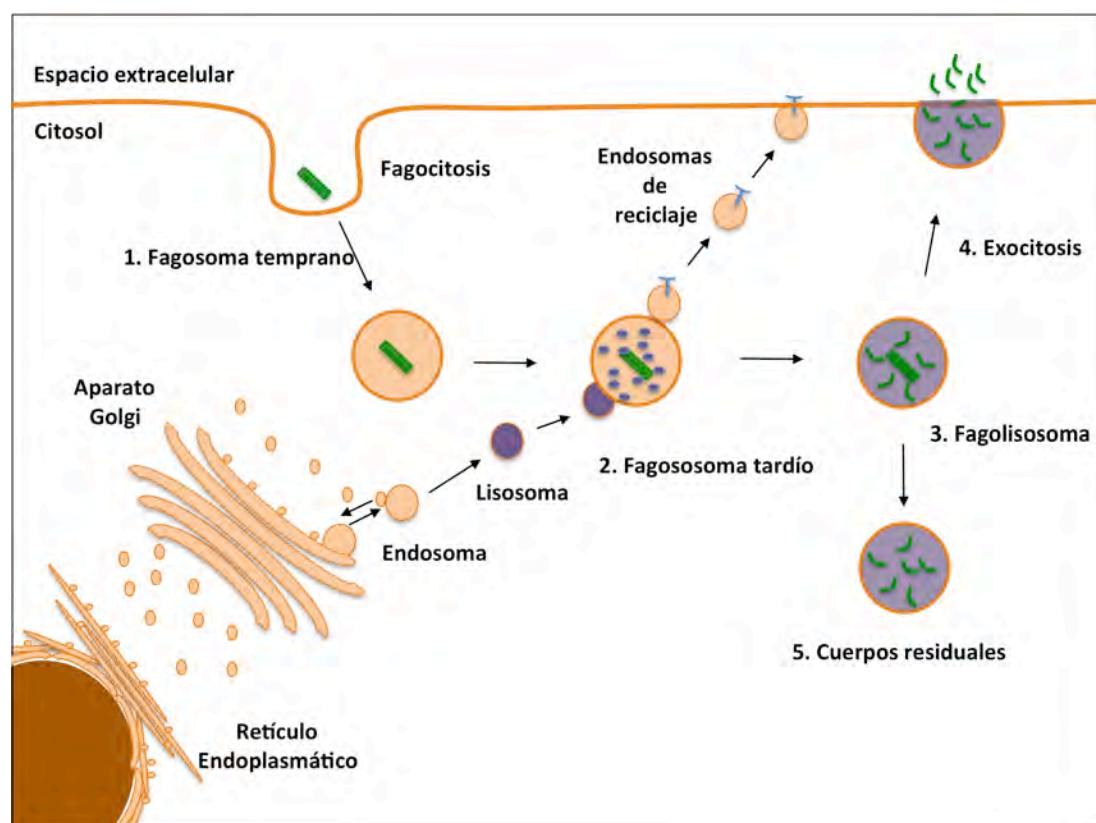


Figura 5. Fagocitosis de sustancias exógenas. El mecanismo de respuesta inmune innata consiste en la internalización de los microorganismos en fagosomas y su destrucción en lisosomas. La maduración de estos orgánulos ocurre mediante eventos de fusión con lisosomas, los cuales acidifican su interior y promueven la degradación de los componentes fagocitados. Una vez digeridos en el fagolisosoma, los cuerpos residuales pueden almacenarse en el interior celular o ser secretados al espacio extracelular. Durante todo este proceso se produce el reciclaje de receptores para su reutilización.

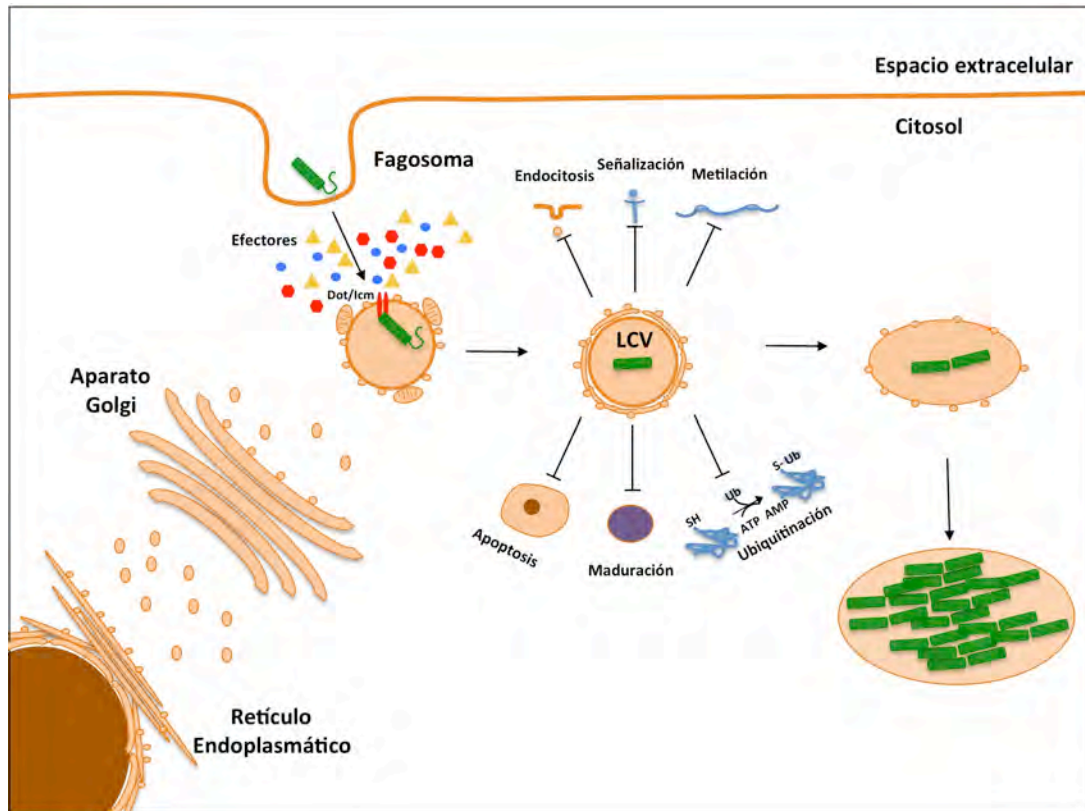


Figura 6. Replicación intracelular de *Legionella pneumophila*. Inmediatamente después de ser fagocitada, la bacteria comienza a liberar efectores al citosol de la célula huésped a través del sistema de secreción tipo IV Dot/Icm (T4SS). La formación de los LCVs se consigue mediante la modificación de la membrana del fagosoma y permite a *Legionella pneumophila* evitar la maduración de este orgánulo. Mediante el uso de aproximadamente 300 efectores la bacteria es capaz de interferir en numerosos procesos celulares y utilizarlos a su favor con el fin de replicarse intracelularmente.

1.3.3. RidL (Lpg2311/Ceg28)

RidL (Retromer interactor decorating LCVs) es uno de los efectores liberados por *Legionella pneumophila* en el citosol de la célula hospedadora. Esta proteína de 131 kDa y 1167 aminoácidos es codificada por el gen *ceg28* (117), y translocada por el sistema de secreción tipo IV Dot/Icm (T4SS) (118). Como la mayor parte de efectores de *Legionella pneumophila* carece de homología de secuencia con otras proteínas conocidas, aunque muestra cierto grado de similitud con la interaptina (109). El papel que desempeña RidL en la replicación de *Legionella pneumophila* parece ser esencial, favoreciendo la proliferación de este patógeno en el interior de amebas y macrófagos desde las primeras fases del crecimiento.

A pesar de la gran cantidad de efectores existentes, la ausencia de RidL reduce en aproximadamente un 50% la capacidad de *Legionella pneumophila* para proliferar intracelularmente. RidL se localiza en la membrana de los LCVs donde es capaz de unirse de forma directa al retrómero a través de la subunidad VPS29. La presencia de RidL en los LCVs provoca una reducción significativa en la cantidad de receptores de tráfico retrógrado, CIMPR y sortilin. Por tanto, RidL parece ser capaz de interferir en la actividad normal del retrómero, reduciendo el tráfico retrógrado y favoreciendo el crecimiento de la bacteria (119). Este mecanismo propuesto está en concordancia con la idea de que el retrómero y las rutas de tráfico retrógrado inhiben la replicación intracelular de *Legionella pneumophila*. No obstante, el mecanismo molecular por el que RidL reconoce al retrómero, así como las implicaciones biológicas de esta asociación en el proceso infeccioso de *Legionella pneumophila* no son comprendidas en detalle.

1.4. Objetivos

La importancia del retrómero y sus proteínas accesorias en el reciclado de receptores se pone de manifiesto por su implicación en numerosos procesos fisiológicos y patológicos de gran relevancia. Sin embargo, a pesar de los recientes avances, muchos aspectos del mecanismo de acción del retrómero y su regulación funcional continúan siendo desconocidos. En este sentido, la finalidad del presente proyecto es contribuir en el establecimiento de un modelo organizativo del retrómero que ayude a entender las bases moleculares de su funcionamiento y manipulación por patógenos intracelulares.

Los objetivos principales de esta tesis han consistido en:

- 1- Análisis a nivel atómico y funcional de la interacción entre el efector de *Legionella pneumophila*, RidL con el retrómero.
- 2- Estudio de la interacción entre el retrómero y la subunidad FAM21 del complejo WASH.
- 3- Análisis estructural de la interacción entre el retrómero y cargos relevantes en la enfermedad de Alzheimer como BACE y APP.

Materiales

2. Materiales

2.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1. Las cepas BL21 y B834 fueron utilizadas para la sobreexpresión de las proteínas nativas y derivadas con selenometionina, respectivamente, mientras que DH5 α y XL1Blue fueron usadas para los métodos de clonaje.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepas	Genotipo	Referencia
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)	Stratagen Corp.
B834	<i>E. coli</i> B F, Δ <i>ompT504</i> , <i>gal-151</i> , <i>met-100</i> , [<i>malB</i> ⁺] _K - ₁₂ (λ ^S), <i>hsdS10</i> , DE46	(120)
XL1Blue	<i>E. coli</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI</i> ^q Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagen Corp.
DH5 α	<i>E. coli</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁺ , m _K ⁺) <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> F ⁻ <i>proAB+</i> <i>lac1</i> Δ M15 <i>ssf::Tn5</i> [Km ^r]	(121)

2.2. Materiales para el cultivo bacteriano

El crecimiento y la sobreexpresión de las cepas bacterianas se realizó en medio Luria Bertani (LB, Pronadisa) o en medio mínimo suplementado con nutrientes (Molecular Dimension Ltd.), en el caso de la expresión de proteínas con Selenometionina (Sigma Aldrich). El crecimiento se llevó a cabo en erlenmeyers de borosilicato (VWR International, LLC), en incubadoras agitadoras del modelo Innova 44 o Excella E24 (New Brunswick Scientific). Para los cultivos realizados en volúmenes pequeños se utilizaron tubos estériles de 50 ml. Los crecimientos en medio sólido se realizaron en placas de LB suplementado con 1.5% agar (w/v). Antes de ser utilizados, todos los medios de cultivo fueron autoclavados durante 20 min. a 134°C. Las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron 100 μ g/ml de ampicilina de sodio (Sigma Aldrich) o 50 μ g/ml de sulfato kanamicina (Sigma Aldrich).

2.3. DNAs

Los DNAs molde del retrómero y SNX3 fueron suministrados por el Dr. Juan S. Bonifacino del Cell Biology and Neurobiology Branch, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NIH, Bethesda, USA).

El DNA molde de RidL fue suministrado por el Dr. Matthias Machner del Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NIH, Bethesda, USA).

El DNA molde de TBC1D5 y VARP, optimizado para su sobreexpresión en *E. coli*, fue obtenido por GenScript USA Inc.

2.4. Anticuerpos

Los anticuerpos secundarios conjugados Alexa Fluor568, utilizados para microscopía de fluorescencia, se compraron en Life Technologies, los anticuerpos frente a VPS35 en GeneTex, los anticuerpos anti- EEA1 en BD Transduction Lab mientras que los anti-GFP (proteína fluorescente verde) conjugados con HRP se adquirieron en Miltenyi Biotec.

2.5. Plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo se muestran en la tabla 2. Las construcciones realizadas fueron insertadas en plásmidos que codifican etiquetas de GST (Glutathione S-transferase), poli-histidinas o fluoróforos como la proteína fluorescente verde (GFP), m-Cherry y la proteína fluorescente amarilla (YFP). Estos vectores contienen múltiples sitios de restricción y la secuencia correspondiente para la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*), la cual permite el corte de la etiqueta. Además, confieren resistencia a diferentes antibióticos (ampicilina o kanamicina) que son utilizados como marcadores de selección.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Propiedades	Resistencia
pET-Sumo3-VPS26 (59)	VPS26 humana con etiqueta de Histidinas en el N-terminal	Kanamicina
pMR101A-VPS29 (60)	VPS29 humana sin etiqueta	Kanamicina
pGST-Parallel2-VPS35 (60)	VPS35 humana con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-VPS35C (60)	VPS35 humana (residuos 476-780) con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-VARPC*	VARP humana (residuos 396-746) con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-VPS29*	VPS29 humana con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-VPS29 _{L152E} *	VPS29 humana con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación L152E	Ampicilina
pGST-Parallel2-VPS29 _{Y163A} *	VPS29 humana con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación Y163A	Ampicilina
pMR101A-VPS29 _{Y163A} *	VPS29 humana sin etiqueta y conteniendo la mutación Y163A	Kanamicina
pGST-Parallel2-VPS29 _{Y165A} *	VPS29 humana con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación Y165A	Ampicilina
pMR101A-VPS29 _{Y165A} *	VPS29 humana sin etiqueta y conteniendo la mutación Y165A	Kanamicina
pGST-Parallel2-RidL*	RidL de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL _{ΔL} *	RidL de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal y los residuos 163-173 sustituidos por una glicina	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL _{Y166A} *	RidL de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación Y166A	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL _{I170D} *	RidL de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación I170D	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL ₁₋₈₆₆ *	RidL (residuos 1-866) de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL ₁₋₄₂₀ *	RidL (residuos 1-420) de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL ₁₋₂₃₆ *	RidL (residuos 1-236) de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL ₃₀₋₂₃₆ *	RidL (residuos 30-236) de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-RidL ₈₆₆₋₁₁₆₇ *	RidL (residuos 866-1167) de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pDB-HisGST-TBC1D5 _{TBC} *	TBC1D5 (residuos 1-419) humano con etiqueta de GST en el N-terminal	Kanamicina
pEGFP-RidL*	RidL de <i>L. pneumophila</i> con etiqueta de GFP en el N-terminal	Ampicilina
pEGFP-RidL _{ΔL} *	RidL de <i>L. pneumophila</i> con el fluoróforo GFP en el N-terminal y los residuos 163-173 sustituidos por una glicina	Ampicilina
pmCherry-RidL*	RidL de <i>L. pneumophila</i> con el fluoróforo m-Cherry en el N-terminal	Kanamicina

Tabla 2 continuación.

Plásmido		Propiedades	Resistencia
pmCherry-RidL Δ L *		RidL de <i>L. pneumophila</i> con el fluoróforo m-Cherry en el N-terminal y los residuos 163-173 sustituidos por una glicina	Kanamicina
pEGFP-RidL ₁₋₂₃₆ *		RidL (residuos 1-236) de <i>L. pneumophila</i> con el fluoróforo GFP en el N-terminal	Ampicilina
pEGFP-RidL _{1-236, ΔL} *		RidL (residuos 1-236) de <i>L. pneumophila</i> con el fluoróforo GFP en el N-terminal y los residuos 163-173 sustituidos por una glicina	Ampicilina
pmCherry-RidL ₁₋₂₃₆ *		RidL (residuos 1-236) de <i>L. pneumophila</i> con el fluoróforo GFP en el N-terminal	Kanamicina
pmCherry-RidL _{1-236, ΔL} *		RidL (residuos 1-236) de <i>L. pneumophila</i> con el fluoróforo mCherry en el N-terminal y los residuos 163-173 sustituidos por una glicina	Kanamicina
pmCherry-SNX12*		SNX12 humana con el fluoróforo mCherry en el N-terminal	Kanamicina
pEYFP-VPS29	(HHMI)	VPS29 humana con el fluoróforo YFP en el N-terminal	Ampicilina
pEGFP-EEA1	(HHMI)	EEA1 humana con el fluoróforo GFP en el N-terminal	Ampicilina
TGN38-mCherry	(HHMI)	TGN38 humana con el fluoróforo m-Cherry en el C-terminal	Kanamicina
pmCherry-Rab5	(HHMI)	Rab5 humana con el fluoróforo mCherry en el N-terminal	Kanamicina
pEGFP-TBC1D5	(HHMI)	TBC1D5 humano con etiqueta de GFP en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-FAM21-R21*		FAM21 (residuos 1312-1341) humano con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-FAM21-R21 _{L1335E} *		FAM21 (residuos 1312-1341) humana con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación L1335E	Ampicilina
pGST-Parallel2-FAM21-R2021*		FAM21 (residuos 1281-1341) humano con etiqueta de GST en el N-terminal	Ampicilina
pGST-Parallel2-FAM21-R2021 _{L1335E} *		FAM21 (residuos 1281-1341) humano con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación L1335E	Ampicilina
pDB-HisGST-VPS35N*		VPS35 humana (residuos 14-476) con etiqueta de GST en el N-terminal	Kanamicina
pGST-Parallel2-VPS35 _{D620N} *		VPS35 humana con etiqueta de GST en el N-terminal y conteniendo la mutación D620N	Ampicilina
pET-Sumo3-VPS26 ₁₋₃₂₀ -BACE ₄₈₀₋₅₀₂ *		VPS26A (residuos 1-320) humana con etiqueta de Histidinas en el N-terminal y fusionada con BACE (residuos 480-502)	Kanamicina
pET-Sumo3-VPS26 ₁₋₃₂₂ -APP ₇₃₉₋₇₅₈ *		VPS26A (residuos 1-322) humana con etiqueta de Histidinas en el N-terminal y fusionada con APP (residuos 739-758)	Kanamicina

Los constructos clonados en este trabajo se indican con un asterisco (*)

La referencia de los constructos que no han sido clonados en este trabajo se indican entre paréntesis

Los constructos cedidos por la Dr. Jennifer Lippincott, Howard Hughes Medical institute, se indican como (HHMI)

2.6. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la construcción de los plásmidos recombinantes se indican en la tabla 3. Todos ellos se diseñaron con una temperatura de fusión (T_m) = 60-70°C y fueron suministrados por Invitrogen con una pureza $\geq 98\%$.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Oligonucleótidos	Método
pGST-Parallel2-RidL	TTTTGGATCCATGATTCTCGAGGAGTACATCCGTATGGCC TTTTGCGGCCGCCCTACTTACGCATCCCTGTACTCGGACTTTTCAG	BamHI/NotI
pGST-Parallel2-RidL $_{\Delta L}$	GAAATGTGCATGGTTGGTTAAAAGAAGAAGCGCTATTTAA CAAATCTACTGGTGTATCTG CAGATAAAACACCAGTAGATTTGTTAATAGCGCCTTCTCTTTT AACCAACCATGCACATTTCC GGCGCCCTGAAAATACAGGTTTTCGGTCGTATCG CGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGCGGC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-RidL $_{Y166A}$	GAAATGTGCATGGTTGGTTAAAAGAAGAAGCGACCCCGACAA TTCTCCGAAAG CTTTCGGAGGAATTGCGGGTCTGCTTCTCTTTTAAACCAACCA TGCACATTTCC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-RidL $_{H170D}$	GGTTAAAAGAAGAATATACCCCGACAGATCCTCCGAAAGCTA TTAACAATCTACTG CAGTAGATTTGTTAATAGCTTTCGGAGGATCTGTCGGGGTAT ATTCTCTTTTAAACC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-RidL $_{1-866}$	TTTTGGATCCATGATTCTCGAGGAGTACATCCGTATGGCC TTTTGCGGCCGCCCTACTTCCCTTTGGCTGCCACATCCAC	BamHI/NotI
pGST-Parallel2-RidL $_{1-420}$	TTTTGGATCCATGATTCTCGAGGAGTACATCCGTATGGCC TTTTTCTAGATTAGCGAGCTTCCGCAATTGCTTCATATC	BamHI/XbaI
pGST-Parallel2-RidL $_{1-236}$	TTTTGGATCCATGATTCTCGAGGAGTACATCCGTATGGCC TTTTTCTAGATTATTCAGTAGGAAAACCCATTGCTTCATATC	BamHI/XbaI
pGST-Parallel2-RidL $_{30-236}$	TTTTGGATCCGAAACTCTTCGTAATGAGCTTGCAAAAGTT TTTTTCTAGATTATTCAGTAGGAAAACCCAAAGGCATTGCGA	BamHI/XbaI
pGST-Parallel2-RidL $_{866-1167}$	CGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCAAAGATGCATTAC TACTACAATTCTGAGGG GCCGCTCGAGACTGCAGGCTCTAGATTGCTTACTTACGCATC CCTGTACTCGGAC GGCGCCCTGAAAATACAGGTTTTCGGTCGTATCG CGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGCGGC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-VPS29	TCCGACAGGATCCGATGTTGGTGGTATTAGGAGATCTG TCCGACTCGAAGTTAAGGTTTTTGTATTGATTGCTGTTCTAC	BamHI/XhoI
pGST-Parallel2-VPS29 $_{L152E}$	CTGTAGAAGCCTGGATATCCATCTCCACAAATGATGGAATAAT GTTTGT ACAACATTATTCATCATTTGTGGAGATGGATATCCAGGCTT CTACAG TCCACCGGTCTGCTGCTGGAACACGTCG CTCGAGCACCCACCACCACCCTGA	Gibson assembly
pGST-Parallel2-VPS29 $_{Y163A}$	TCCAATTAGCTGATACACAGCGGTGACCACTGTAGAAGCC GGCTTCTACAGTGGTCACCGCTGTGTATCAGCTAATTGGA TCCACCGGTCTGCTGCTGGAACACGTCG CTCGAGCACCCACCACCACCCTGA	Gibson assembly
pMR101A-VPS29 $_{Y163A}$	TCCAATTAGCTGATACACAGCGGTGACCACTGTAGAAGCC GGCTTCTACAGTGGTCACCGCTGTGTATCAGCTAATTGGA GACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAG CTCATGGTTATGGCAAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-VPS29 $_{Y165A}$	CATCATCTCCAATTAGCTGAGCCACATAGGTGACCACTGTAG CTACAGTGGTCACCTATGTGGCTCAGCTAATTGGAGATGATG TCCACCGGTCTGCTGCTGGAACACGTCG CTCGAGCACCCACCACCACCCTGA	Gibson assembly
pMR101A-VPS29 $_{Y165A}$	TCCAATTAGCTGATACACAGCGGTGACCACTGTAGAAGCC GGCTTCTACAGTGGTCACCGCTGTGTATCAGCTAATTGGA GACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAG CTCATGGTTATGGCAAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTC	Gibson assembly
pDB-HisGST-TBC1D5 $_{TBC}$	CGACCGAAAACCTTTACTTCCAGGGCCATATGTATCATTCT TATCTGAACTAGACATCC TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTATCTTGGATTTT TCTTTGGATCTTAAGG ATGGCCCTGGAAGTAAAGTTTTTCGGTCTTGGGATATCG CTCGAGCACCCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGC	Gibson assembly

Tabla 3 continuación.

Plásmido	Oligonucleótidos	Método
pGST-Parallel2-VARPC	TTTTGGATCTCTCCACCGACTGCCTGTTAAGC TGACCAGCCAGCCAGGACGGCTCCTCTAACTCGAGAAAA	BamHI/XhoI
pEGFP-RidL	CTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGATGATTCTCGAGGAGT ACATCCGTATGG CGGGCCCGCGGTACCGTCGACCTTACGCATCCCTGTACT CGGACTTTCAGG	Gibson assembly
pEGFP-RidL _{ΔL}	CTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGATGATTCTCGAGGAGT ACATCCGTATGG CGGGCCCGCGGTACCGTCGACCTTACGCATCCCTGTACT CGGACTTTCAGG	Gibson assembly
pmCherry-RidL	CTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGATGATTCTCGAGGAGT ACATCCGTATGG CGGGCCCGCGGTACCGTCGACCTTACGCATCCCTGTACT CGGACTTTCAGG	Gibson assembly
pmCherry-RidL _{ΔL}	CTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGATGATTCTCGAGGAGT ACATCCGTATGG CGGGCCCGCGGTACCGTCGACCTTACGCATCCCTGTACT CGGACTTTCAGG	Gibson assembly
pEGFP-RidL ₁₋₂₃₆	GAATGCCTTGGGTTTTCTACTGAACCGAGTACAGGGATGCGTAAG CTTACGCATCCCTGTACTCGGTTCACTAGGAAAACCAAGGCATT	Gibson assembly
pEGFP-RidL _{1-236, ΔL}	GAATGCCTTGGGTTTTCTACTGAACCGAGTACAGGGATGCGTAAG CTTACGCATCCCTGTACTCGGTTCACTAGGAAAACCAAGGCATT	Gibson assembly
pmCherry-RidL ₁₋₂₃₆	GAATGCCTTGGGTTTTCTACTGAACCGAGTACAGGGATGCGTAAG CTTACGCATCCCTGTACTCGGTTCACTAGGAAAACCAAGGCATT	Gibson assembly
pmCherry-RidL _{1-236, ΔL}	GAATGCCTTGGGTTTTCTACTGAACCGAGTACAGGGATGCGTAAG CTTACGCATCCCTGTACTCGGTTCACTAGGAAAACCAAGGCATT	Gibson assembly
pmCherry-SNX12	CTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCG GTCGACGGTACCGCGGGCCCG	Gibson assembly
pGST-Parallel2-FAM21-R21	CGATACGACCGAAAACTGTATTTTCAGGGCGCCTGGGCACCT GAACCAAGATTTGAACACAAGGTGTC GCCGCTCGAGACTGCAGGCTCTAGATTCTGCTTACTGGCCTCAA AGGCATTCAGGGGATCATC GGCGCCTGAAAAACAGGTTTTTCGGTCTGATCG CGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGCGGC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-FAM21-R21 _{L1335E}	ACATCTTTGATGATCCCGAAAAATGCCTTTGGAGGCCAG CTGGCCTCAAAGGCATTTTCGGGATCATCAAAGATGT	Gibson assembly
pGST-Parallel2-FAM21-R2021	CGATACGACCGAAAACTGTATTTTCAGGGCGCCTGGTCCAAA AAGAAAGTGGAAAGCCAAAGTCTATAT GCCGCTCGAGACTGCAGGCTCTAGATTCTGCTTACTGGCCTCAA AGGCATTCAGGGGATCATC GGCGCCTGAAAAACAGGTTTTTCGGTCTGATCG CGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGAGCGGC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-FAM21-R2021 _{L1335E}	ACATCTTTGATGATCCCGAAAAATGCCTTTGGAGGCCAG CTGGCCTCAAAGGCATTTTCGGGATCATCAAAGATGT	Gibson assembly
pDB-HisGST-VPS35N	CGACCGAAAACCTTTACTTCCAGGGCCATAAGCTCTTGATGA AGCCATACAGGCTGTG TCAAGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTAATCTGAATCAAC GTGGATACCAAATTCATTATGG ATGGCCCTGGAAGTAAAGTTTTTCGGTCTGTTGGGATATCG CTCGAGCACCACCACCACCACCAGTCTCGGCTGC	Gibson assembly
pGST-Parallel2-VPS35 _{D620N}	GTATGAAGATGAAATCAGCAATTCCAAAGCACAGCTAGCT AGCTAGCTGTGCTTTGGAATTGCTGATTCATCTTCATAC	Gibson assembly
pET-Sumo3-VPS26 ₁₋₃₂₀ -BACE ₄₈₀₋₅₀₂	CACCAGCGATTTGAATCTCCAGAATCACAGGCACAGTGGCGCG CCCTCCGCGCCCTGCCAGCAGCATG CACCAGCGATTTGAATCTCCAGAATCACAGGCACAGTGGCGCG CCCTCCGCGCCCTGCCAGCAGCATG	Gibson assembly
pET-Sumo3-VPS26 ₁₋₃₂₂ -APP ₇₃₉₋₇₅₈	GAATCTCCAGAATCACAGGCATCTGCCGACGCAGCGGTAACCC CGGAAG CGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTATTTCGTAACCGTTCT GCTGCATTTAGACAGG	Gibson assembly

2.7. Péptidos

La síntesis del péptido RidL_{loop} fue realizada por GenScript con un porcentaje de pureza superior al 98%.

2.8. Proteasa TEV

La proteasa TEV se utilizó para separar las proteínas marcadas de sus etiquetas mediante el reconocimiento de su secuencia de corte específica. El plásmido que codifica para esta proteína fue suministrado por el Dr. David S. Waugh (NCI, CCR, USA), se expresó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se purificó siguiendo el protocolo descrito previamente por Alsarraf *et. al.* (122).

2.9. Kits comerciales de soluciones de cristalización

La búsqueda de condiciones óptimas para la obtención de cristales de las proteínas y complejos estudiados se llevó a cabo en la plataforma de rayos X de CIC bioGUNE, utilizando los kits comerciales de soluciones de cristalización indicados en la tabla 4.

Tabla 4. Kits comerciales de soluciones de cristalización utilizados en este trabajo.

Kits de cristalización	Casa comercial	Nº catálogo
Crystal screen 1/2	Hampton Resarch Corp.	HR2-110/112
PEG Ion 1/2	Hampton Resarch Corp.	HR2-126/098
PEG RX 1/2	Hampton Resarch Corp.	HR2-082/084
Index	Hampton Resarch Corp.	HR2-144
Salt RX 1/2	Hampton Resarch Corp.	HR2-107/109
Grid Screen TM MPD	Hampton Resarch Corp.	HR2-215
Grid Screen ^{IM} Ammonium Sulphate	Hampton Resarch Corp.	HR2-211
Crystal Screen Cryo ^{IM}	Hampton Resarch Corp.	HR2-122
Natrix ^{IM}	Hampton Resarch Corp.	HR2-116
Structure screen 1/2	Molecular Dimension Ltd.	MD1-01/02
PACT premier	Molecular Dimension Ltd.	MD1-36
ProPlex ^{IM}	Molecular Dimension Ltd.	MD1-38
Morpheus TM	Molecular Dimension Ltd.	MD1-46
JCSG-Plus TM	Molecular Dimension Ltd.	MD1-37
NR-LBD	Molecular Dimension Ltd.	MD1-24
PEGs Suite	QIAGEN	130716

Métodos

3. Métodos

3.1. Métodos de clonaje

3.1.1. Amplificación de DNA mediante PCR

La amplificación de secuencias de DNA se realizó mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando la polimerasa Phusion® High-Fidelity DNA (Thermo) y los oligonucleótidos indicados en la tabla 3. La T_m es la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos y se calculó con el servidor OligoCalc (<http://www.biotools.nubic.northwestern.edu/oligoCalc>). La mezcla de reacción y los ciclos de amplificación empleados se muestran en la tabla 5. El control de los ciclos de temperatura requeridos se llevó a cabo mediante el termociclador TProfessional Basic (Biometra GmbH) usando las especificaciones del fabricante.

Tabla 5. Mezcla de reacción (A) y ciclos de amplificación de la PCR (B).

A

Reactivos	V (ml)
Tampón Phusion HF Buffer (5X)	20 μ l
dNTPs (10 mM)	2 μ l
Oligonucleótidos up/low (10 mM)	5+5 μ l
DNA molde (1 mg/ μ l)	1 μ l
Polimerasa Phusion DNA (Thermo)	1 μ l
Agua mq (libre de nucleasas)	66 μ l

B

Etapas	Temp.	Tiempo (s)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	98°C	30	1
Desnaturalización	98°C	10	30
Alineamiento	T_m	30	
Extensión	72°C	60 s/Kb	
Extensión Final	72°C	300	1

3.1.2. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de DNA amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1-2% (w/v). Para su preparación la Agarosa D1 Low EEO (Pronadisa) se disolvió en tampón TAE 1x (40 mM acetato, 1 mM EDTA y 40 mM Tris pH 8.0) y se le añadió SYBR® Safe (Invitrogen) en una proporción 1:10000 (v/v) para facilitar la visualización de las muestras. Las muestras de DNA se mezclaron con tampón de carga 6x (Thermo) en un ratio de 5:1 (v/v) antes de ser cargadas en el gel. Para determinar su tamaño se cargó el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA (Thermo). La electroforesis se llevó a cabo en

cubetas horizontales de BioRad aplicando un voltaje de 120 V. La visualización de las muestras se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

3.1.3. Digestión con enzimas de restricción y defosforilación

Los plásmidos y productos de PCR amplificados se digirieron mediante diferentes enzimas de restricción (NEB) a 37°C durante 12 horas. Las enzimas de restricción utilizadas se escogieron en base a las características de la secuencia y, para su aplicación, se emplearon los tampones de reacción recomendados por el fabricante. Posteriormente, las enzimas de restricción se inactivaron mediante choque térmico a 65°C durante 5 min. Para incrementar la eficiencia de la ligación y evitar la recircularización de los vectores se defosforilaron los grupos fosfatos terminales mediante la incubación con CIAP (Calf Intestinal Alkaline Protease, Invitrogen). Este proceso se desarrolló a 37°C durante 2 horas en el tampón de reacción específico.

3.1.4. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

Los productos de PCR y los vectores de clonación digeridos se purificaron con el kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega). Posteriormente, 50 ng de vector con un exceso de entre 3 y 6 veces en ratio molar del inserto, se incubaron a 37°C durante 12 horas siguiendo el protocolo especificado por el fabricante para la ligasa del fago T7 (NEB).

3.1.5. Gibson assembly

Los productos de PCR purificados se incubaron con el “Isothermal mix” (tabla 6) durante 60 minutos y posteriormente la mezcla se transformó a células *E. coli* XL1 Blue.

Tabla 6. Mezcla de reacción (A) y composición del “Isothermal mix” para 10 reacciones (B).

A		B	
Reactivos	pmoles	<i>Isothermal mix (10X)</i>	
PCR inserto	300-500	40 μ l <i>Isothermal buffer</i>	
PCR vector	100	1.5 μ l T5 exonucleasa 1U/ μ l (NEB)	
+ 15 μ l <i>Isothermal mix</i>		2.5 μ l Polimerasa Phusion (NEB)	
		10 μ l Taq Ligasa (NEB)	
		96 μ l H ₂ O	

3.1.6. Transformación por choque térmico

Los plásmidos recombinantes se introdujeron en las cepas de *E. coli* XL1 Blue/DH5 α para la propagación del DNA. Para ello, se añadieron 3 μ l de la mezcla de ligación a 50 μ l de células competentes y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Pasado este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos. La mezcla se volvió a introducir en hielo durante 2 minutos y después se añadió 500 μ l de medio LB previamente atemperado. Las células se mantuvieron a 37°C durante 1 hora en agitación y fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 1 minuto. El pellet celular, obtenido tras descartar el sobrenadante, se resuspendió en 50 μ l de medio LB y se sembró en una placa de LB/agar suplementada con el antibiótico apropiado para cada plásmido. Las placas permanecieron durante al menos 12 horas a 37°C hasta observar colonias de tamaño suficiente.

3.1.7. PCR de comprobación

Para comprobar la presencia del inserto en los plásmidos recombinantes se llevó a cabo la amplificación por PCR de diferentes colonias. Para ello, cada colonia individual se resuspendió en la solución comercial de Taq polimerasa (PCR Master Mix, Thermo) y utilizando los oligonucleótidos de la etiqueta de los plásmidos se realizó una PCR siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. La presencia del inserto se determinó mediante electroforesis de gel de agarosa. Las

colonias testadas se re-estriaron en una placa de LB/agar suplementada con antibiótico.

3.1.8. Extracción de DNA

Las colonias cuya amplificación dio una banda del tamaño esperado se pusieron a crecer en 10 ml de medio LB, suplementado con su correspondiente antibiótico, en un tubo falcon estéril. Una vez obtenida una turbidez suficiente, los plásmidos recombinantes se extrajeron utilizando el kit comercial Wizard® Plus SV Miniprep DNA purification system (Promega) y se cuantificó la concentración de DNA en función de su absorbancia a 260 nm.

3.1.9. Secuenciación DNA

La secuenciación de los plásmidos recombinantes se llevó a cabo por el servicio de secuenciación Stabvida. La secuencia facilitada se comparó con la esperada mediante el programa CLC Sequence Viewer 7.0 (Qiagen) para confirmar la existencia del inserto correcto.

3.2. Caracterización de las proteínas

3.2.1. Determinación de los parámetros físico-químicos

El cálculo de diferentes parámetros como el punto isoeléctrico, el coeficiente de extinción molar teórico, la hidrofobicidad así como el peso molecular teórico (en Daltons) fueron obtenidos mediante el programa Protparam del servidor ExPaSy Bioinformatic Resource Portal (<http://web.espasy.org/protparam>).

3.2.2. Predicción de estructura secundaria

La predicción de la estructura secundaria de los diferentes constructos utilizados se llevó a cabo mediante el servidor Phyre2 (<http://sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>).

3.2.3. Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína en solución se calculó a partir de la absorbancia obtenida a 280 nm (A_{280}), aplicando el coeficiente de extinción molar proporcionado por el servidor ExPaSy (ϵ_{prot} ; g/l). Este servidor estima el coeficiente de extinción molar teórico de una proteína (ϵ_{prot}) en una solución acuosa, en base a su composición aminoacídica (ecuación 1).

$$\epsilon_{\text{prot}} = (\#_{\text{Tyr}} \cdot \epsilon_{\text{Tyr}}) + (\#_{\text{Trp}} \cdot \epsilon_{\text{Trp}}) + (\#_{\text{Cst}} \cdot \epsilon_{\text{Cst}}) \quad \text{ecuación 1}$$

donde (a 280 nm): $\epsilon_{\text{Tyr}} = 1490$, $\epsilon_{\text{Trp}} = 5500$, $\epsilon_{\text{Cst}} = 125$

La A_{280} se midió con un Nanodrop y la concentración de la proteína se estimó mediante la ley de Lambert-Beer (ecuación 2).

$$A_{280} = \epsilon_{\text{prot}} \cdot C \cdot l \quad \text{ecuación 2}$$

donde l es la longitud atravesada por la luz en cm y C la concentración de proteína en g/l

3.2.4. Determinación de la solubilidad de los péptidos

La predicción de la solubilidad de los péptidos utilizados se estimó mediante el servidor Pepcalc (<http://pepcalc.com/peptide-solubility-calculator>).

3.2.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida

El análisis de las proteínas se realizó en geles SDS de poliacrilamida (12-15% w/v) de 6.1 cm de longitud. Antes de su carga en el gel, las muestras fueron mezcladas con tampón de carga Laemmli 5x (BioRad) suplementado con 10 mM de β -mercaptoetanol (β -ME), y calentadas durante 5 minutos a 90°C. Para comparar el tamaño de las proteínas se utilizó el marcador de peso molecular

Precision plus protein dual color standards (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales a 150V en “running buffer” (50 mM MES, 0.1% w/v SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7.4). Para la tinción de los geles de poliacrilamida se usó la solución Coomassie Brilliant Blue R-250 (1g Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% etanol y 9.2% ácido acético) mientras que para su aclarado se utilizó la mezcla 40% metanol, 10% ácido acético glacial (v/v).

En el caso de las proteínas de bajo peso molecular los geles utilizados fueron los de Tricina-SDS, los cuales fueron preparados de acuerdo al protocolo descrito por Schägger (123). En este caso el potencial utilizado para migrarlos fue 100V y para su visualización se empleó el método descrito anteriormente.

3.3. Producción de las proteínas recombinantes

3.3.1. Expresión de proteínas nativas

La sobreexpresión de las proteínas nativas se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Tras realizar una dilución 1:1000 de un cultivo saturado en medio LB, las células crecieron a 37°C durante 6 horas y la expresión se indujo al alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD) de 0.8 mediante la adición de 0.5 mM de isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG).

3.3.2. Expresión de proteínas derivatizadas con selenio

La expresión de las proteínas derivatizadas con selenometionina se realizó en la cepa de *E. coli*, auxótrofa para metionina, B834(DE3). Las células crecieron a 37°C en medio LB hasta alcanzar una OD de 1.0. En ese momento, fueron colectadas mediante centrifugación a 5044 gs y resuspendidas en medio base suplementado con nutrientes SeMet (Molecular Dimensions). Después de permanecer 20 minutos a 37°C se añadió al medio 0.2 mM de selenometionina (Acros Organics) y 0.5 mM de IPTG y las células se cultivaron a 20°C durante toda la noche.

3.3.3. Purificación de proteínas

La purificación de los diferentes constructos nativos y derivados de RidL y FAM21 así como VPS35C, TBC1D5_{TBC} y VPS29 con sus diferentes mutantes puntuales se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo. El cultivo celular se centrifugó a 48000 gs durante 20 minutos y el pellet se resuspendió en tampón A [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT)] suplementado con 0.1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 1 mM benzamidina. Después, el homogenizado se sonicó y se clarificó mediante centrifugación a 20000 rpm durante 1 hora. Para la separación de las proteínas recombinantes del resto de proteínas celulares se utilizó una resina GSH-Sepharose (GE Healthcare), la cual se lavó extensivamente con tampón A y tampón B (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT). El paso siguiente consistió en la incubación de la resina con la proteasa TEV en tampón B, para separar la etiqueta de GST de la proteína, o en la elución de las proteínas de fusión junto a la etiqueta con glutatión reducido (Acros Organics). Posteriormente, las proteínas se purificaron mediante separación por carga, usando una cromatografía de intercambio iónico (HitrapQ, GE Healthcare) con un gradiente lineal de NaCl. El paso final consistió en la separación por tamaño a través de una cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 16/60 o Superdex 75 16/60, GE Healthcare) en buffer B. Todos los pasos de purificación se desarrollaron a 4°C.

El retrómero y sus mutantes puntuales fueron purificados siguiendo el protocolo descrito en Lucas *et al.* (56), VARPc se purificó siguiendo el método de Hesketh *et al.* (66) mientras que VPS35C/29 se obtuvo utilizando la metodología propuesta por Hierro *et al.* (60).

3.3.4. Formación de complejos proteicos

Para la formación de los complejos proteicos se siguió el siguiente protocolo, las proteínas purificadas se incubaron en un ratio molar de 1:1.5 (con un exceso de la proteína de menor tamaño) y la mezcla fue purificada por cromatografía de

filtración en gel (Superdex 200 16/60 o Superdex 75 16/60, GE Healthcare) en buffer C (25 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT).

Para la obtención de los complejos utilizados para SAXS, los complejos preformados se purificaron nuevamente mediante cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 10/300 GL) en buffer D (25 mM Tris 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM TCEP) o en buffer E (25 mM Tris 7.5, 300 mM NaCl, 0.5 mM TCEP).

3.3.5. Ensayos “pull-down”

Los ensayos de interacción mediante “pull-down” se realizaron utilizando las proteínas purificadas. Para la identificación de la región de interacción de RidL implicada en la unión con el retrómero, se incubó VPS29-VPS35C-GST (20 μ M) se incubó con los diferentes constructos de RidL (20 μ M) durante 1 hora. Después se añadió a la mezcla 20 μ l de resina GSH-Sepharose (GE Healthcare) y se incubó la muestra en agitación suave durante 1 hora. La resina se lavó con 1 ml de tampón C tres veces mediante centrifugación (5 minutos a 6000 gs). Las proteínas que permanecieron unidas a la resina se eluyeron con tampón de carga Lemmli 5x (BioRad) y se visualizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250.

Los ensayos con los diferentes mutantes puntuales de VPS29 se llevaron a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente con la diferencia de que GST-RidL fue la proteína que se incubó con VPS29 y las diferentes formas de esta proteína.

3.3.6. Ensayos de competición

Para la realización de los ensayos de competición los complejos preformados fueron nuevamente purificados mediante cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 10/300 GL) para eliminar el posible exceso de cualquiera de las proteínas. Después, estos complejos fueron incubados durante 1 hora con una cantidad equimolar de RidL, en el caso del complejo formado por TBC1D5_{TBC} y

retrómero, o TBC1D5_{TBC}, en el caso del complejo RidL-retrómero. Finalmente, esta mezcla se fraccionó mediante cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 10/300 GL) en buffer E.

3.4. Análisis estructural mediante cristalografía de rayos X

3.4.1. Teoría de la difracción de rayos X

La cristalografía de rayos X es una de las técnicas principales en el estudio estructural de macromoléculas a nivel atómico. Esta técnica permite obtener la densidad electrónica de un cristal, a partir de la dispersión de los rayos X difractados por él. Las ondas dispersadas pueden interactuar cooperativamente, dando lugar a un fenómeno conocido como interferencia constructiva, o por el contrario pueden anularse lo que se conoce como interferencia destructiva. Un cristal de proteína funciona como una rejilla de difracción tridimensional que provoca interferencias destructivas y constructivas, creando un patrón de difracción que contiene información sobre la distribución y el tipo de átomos que componen el cristal.

El patrón de difracción obtenido se puede interpretar matemáticamente tratando el cristal como un conjunto de planos, separados por una distancia d , en los que las ondas inciden y se reflejan con un ángulo θ . Como puede observarse en la figura 7, la onda superior alcanzará el detector antes que la inferior debido a que recorre una distancia menor. Por tanto, en el momento en el que alcanzan el detector estas ondas estarán fuera de fase si la diferencia entre la distancia recorrida ($2d \cdot \sin\theta$) es un número entero de la longitud de onda (λ). En este caso, la interferencia constructiva entre las dos ondas es máxima, dando lugar a lo que se conoce como ley de Bragg (ecuación 3).

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

ecuación 3

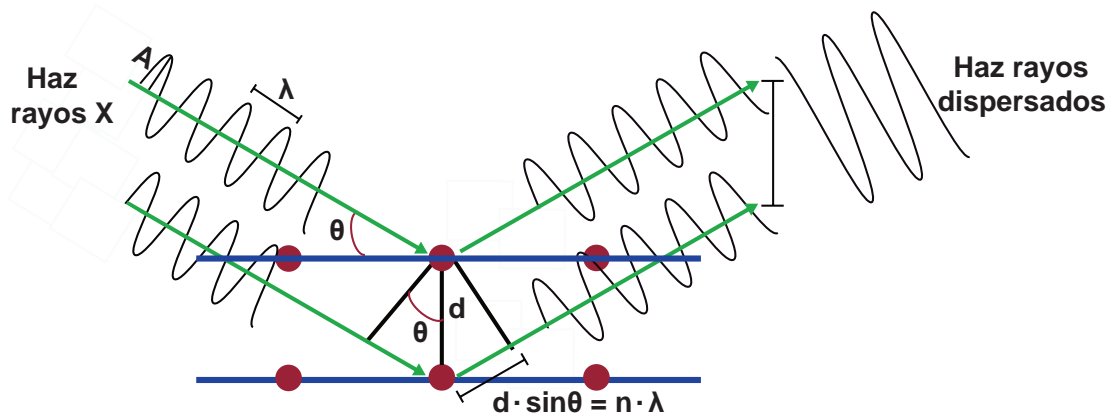


Figura 7. Representación esquemática de la ley de Bragg. La interferencia constructiva entre dos ondas incidentes con un ángulo θ , sólo se produce si la diferencia de la distancia recorrida ($d \cdot \sin\theta$) es un número entero de la longitud de onda (λ).

Una forma más sencilla de representar una onda es mediante un vector en un sistema de dos dimensiones, donde su magnitud es la amplitud de la onda ($|F|$) y el ángulo que subtiende con la horizontal es equivalente a la fase (α) (fig. 8). De esta forma, una onda puede expresarse como si estuviera compuesta por dos ondas, una con fase 0 y amplitud $F \cos \alpha$ (parte real) y otra con fase 90° y amplitud $F \sin \alpha$ (parte imaginaria). Pese a que esta representación facilita la visualización de la suma de ondas con diferentes fases, no es práctica a la hora de sumar miles de ondas por lo que se utiliza la representación exponencial (ecuación 4).

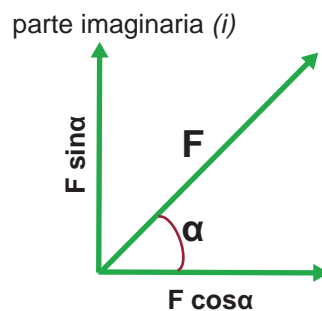


Figura 8. Representación vectorial de una onda mediante el diagrama de Argand. El vector F posee un componente real ($F \cos \alpha$) y un componente imaginario ($F \sin \alpha$).

$$F = F \cos \alpha + iF \sin \alpha = F \cdot e^{i\alpha} \quad \text{ecuación 4}$$

La dispersión de los rayos X por un sistema de dos electrones e_1 y e_2 , separados por una distancia r , se puede representar en relación de la onda incidente (s_0) y la onda dispersada (s) mediante el sumatorio de las ondas 1 y 2 (fig. 9). Asumiendo que los vectores s_0 y s tienen una magnitud $1/\lambda$, la diferencia de distancia recorrida entre las dos ondas será $(p + q)$, donde $p = \lambda(r \cdot s_0)$ y $q = -\lambda(r \cdot s)$, luego $[p + q = \lambda r \cdot (s_0 - s)]$. Por tanto, si definimos $S = s - s_0$, la fase de la onda dispersada será $2\pi r \cdot S$, y el vector T representará el sumatorio de dos ondas de amplitud 1 dispersadas por e_1 y e_2 con su origen en e_1 (ecuación 5):

$$T = e^{2\pi i r \cdot S}$$

ecuación 5

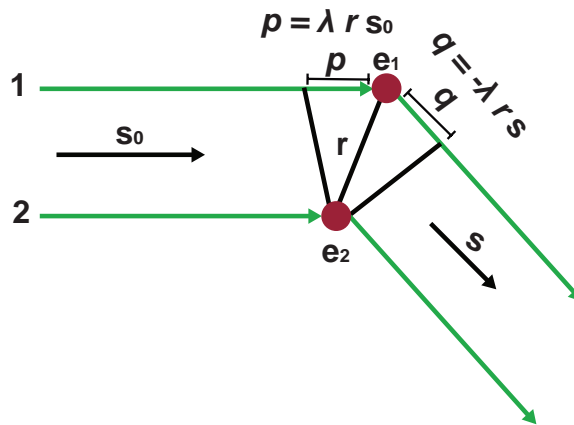


Figura 9. Sistema de dos electrones (e_1 y e_2). La diferencia de distancia recorrida entre la onda 1 y 2 es $p + q$.

Utilizando la expresión anterior, la onda dispersada por un átomo se puede expresar en función de su densidad electrónica, $\rho(r)$, y su posición respecto al origen (r). Esta ecuación se conoce como factor de dispersión atómico (ecuación 6).

$$f(r) = \int_r \rho(r) e^{2\pi i r \cdot s} dr$$

ecuación 6

De esta forma, el sumatorio de las ondas dispersadas por una celda que contiene n átomos localizados en las posiciones r_j ($j=1,2,\dots,n$) se conoce como factor de estructura y se calcula utilizando la ecuación 7.

$$F(\mathbf{s}) = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{s}} \quad \text{ecuación 7}$$

donde f_j es el factor de dispersión de cada átomo

Esta función, depende de la posición relativa de los átomos dentro del cristal, $r(j)$, y se puede expresar en función de la densidad electrónica, $\rho(r)$, (ecuación 8).

$$F(\mathbf{s}) = \int_{\text{celda}} \rho(r) e^{2\pi i \mathbf{r}_j \cdot \mathbf{s}} dV \quad \text{ecuación 8}$$

La ecuación 7 se puede utilizar para calcular la dispersión de un cristal que contiene n_1 celdas unidad en la dirección a, n_2 en la dirección b y n_3 en la dirección c. La dispersión total del cristal (K_s) dependerá de la contribución del total de celdas unidad y de su posición respecto al origen ($t \cdot a + u \cdot b + v \cdot c$) (ecuación 9).

$$K(s) = F(s) \times \sum_{t=0}^{n_1} e^{2\pi i t a \cdot s} \times \sum_{u=0}^{n_2} e^{2\pi i u b \cdot s} \times \sum_{v=0}^{n_3} e^{2\pi i v c \cdot s} \quad \text{ecuación 9}$$

Dado que n_1 , n_2 y n_3 son muy grandes la amplitud de la dispersión es 0, excepto cuando:

$$\mathbf{a} \cdot \mathbf{s} = h; \mathbf{b} \cdot \mathbf{s} = k; \mathbf{c} \cdot \mathbf{s} = l$$

Estas condiciones se conocen como las condiciones de difracción de Laue

Por tanto, expresado en función de la densidad electrónica, el factor de estructura de un cristal con volumen V , se calcula con la siguiente ecuación (ecuación 10).

$$F(hkl) = V \iiint \rho(xyz) e^{2\pi i (hx+ky+lz)} dx dy dz \quad \text{ecuación 10}$$

donde $\rho(xyz)$ es la densidad electrónica y $dv = V \cdot dx dy dz$

El objetivo final de la cristalografía de proteínas es calcular la densidad electrónica del cristal, $\rho(xyz)$. De la ecuación 10 se deduce que $F(h,k,l)$ es la transformada de Fourier de la densidad electrónica en cada punto del cristal. Por tanto, para calcular la densidad electrónica, $\rho(xyz)$, es necesario realizar la transformación inversa de Fourier (ecuación 11).

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)} \quad \text{ecuación 11}$$

Conociendo el factor de estructura en magnitud y en fase para todas las reflexiones, hkl , se puede calcular la densidad electrónica para cada punto en el cristal. Sin embargo, del patrón de difracción solo se puede extraer de manera directa la amplitud, relacionada con las intensidades, mientras que la fase, $\alpha(hkl)$, debe ser calculada mediante métodos indirectos, conociéndose en cristalografía como el problema de las fases.

3.4.2. Cristalización

En cristalografía, para magnificar la señal se necesita un sistema ordenado en el que las moléculas se repitan regularmente a lo largo de las tres dimensiones del objeto. Un cristal de proteína contiene millones de repeticiones de la misma molécula y funciona como una rejilla de difracción para crear un patrón de difracción. Debido a su periodicidad, los cristales pueden descomponerse en unidades más simples. La unidad asimétrica es la mínima porción que por operaciones de simetría forma la celda unidad, mientras que la celda unidad por operaciones de traslación da lugar al cristal. Las imperfecciones en su empaquetamiento resultan en una mala calidad de difracción. Por tanto, la obtención de monocristales de calidad suficiente como para resolver la estructura de las proteínas es uno de los cuellos de botella de la cristalografía de rayos X.

En este estudio, la cristalización de las proteínas se llevó a cabo mediante difusión de vapor. En este método las gotas de proteína, mezcladas con la

solución precipitante, se colocan en un recipiente cerrado sobre una cubierta siliconizada para permitir que se equilibren frente al reservorio de la solución precipitante. Existen dos modalidades de este método denominadas gota sentada y gota colgante, los cuales se diferencian en función del lugar donde se coloca la proteína (fig. 10). En general, la búsqueda de condiciones de cristalización adecuadas se realiza mediante dos etapas diferentes. En primer lugar se analiza una amplia selección de condiciones químicas, disponibles en kits comerciales. En segundo lugar, se refinan las condiciones obtenidas en placas de mayor tamaño, variando diferentes parámetros como la concentración de proteína y precipitante, el pH y la presencia de aditivos. En este trabajo, la búsqueda de soluciones precipitantes adecuadas se realizó principalmente utilizando el método de gota sentada mientras que el refinamiento de las condiciones se llevó a cabo mediante el método de gota colgante.

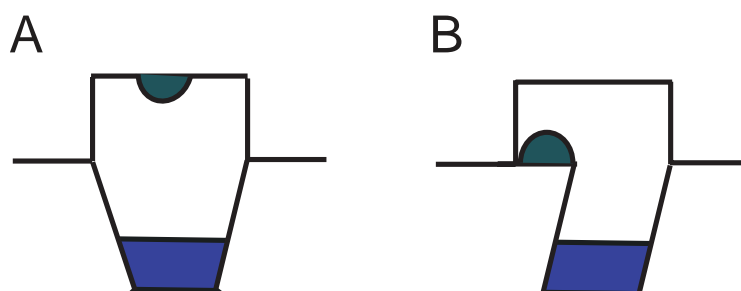


Figura 10. Cristalización de macromoléculas mediante difusión de vapor. (A) Método de gota colgante. (B) método de gota sentada.

En este estudio, todas las formas cristalinas de las que se adquirieron datos de difracción de calidad suficiente se obtuvieron mediante el método de gota colgante a 18°C. Los cristales nativos y derivados con selenometionina de RidL₁₋₈₆₆ se consiguieron mezclando 1 µl de proteína a una concentración de entre 100 y 120 µM con 1 µl de solución precipitante formada por 0.4 M NaF, 14-16% (w/v) polietilenglicol (PEG) 3350 y 0.1 M Bis-tris propano pH 7.5. Los mejores cristales crecieron con forma cúbica y aparecieron después de 5 días. Para crioprotegerlos se utilizó el precipitante suplementado con 20% (v/v) de glicerol. Tras 5 minutos en esta solución se congelaron en nitrógeno líquido. Los cristales nativos y derivados con selenometionina del complejo RidL₁₋₂₃₆-VPS29-VPS35C

se lograron en condiciones de cristalización formadas por 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris pH 8.0 y 4-8 % (v/v) PEG 6000. Para ello, el complejo purificado se concentró a 7.5 mg/ml y se mezcló en un ratio 1:1 con la solución precipitante. Los cristales surgieron entre 2 y 5 días después y presentaron una forma alargada en forma de barra. Para su crioprotección se empleó la condición de cristalización suplementada con 25 % etilenglicol. Los cristales del complejo formado por VPS29-VPS35 y RidL_{loop} se obtuvieron mezclando el complejo purificado VPS29-VPS35C a una concentración de 143 μ M con un exceso molar del péptido de RidL (1.5 mM). Los cristales crecieron tres días después en solución precipitante formada por 0.1 M NaCl, 20% (w/v) PEG 3350 y 0.1M Tris pH 8.5. Para su crioprotección se utilizó el mismo protocolo descrito para el complejo RidL₁₋₂₃₆-VPS29-VPS35C. Finalmente, la cristalización de los complejos VPS26-VPS35N-SNX3-APP₇₃₉₋₇₅₂ y VPS26-VPS35N-SNX3-BACE₄₈₀₋₅₀₂ se consiguió mezclando 45 μ M del complejo purificado VPS26-VPS35 con un exceso molar de tres veces de SNX3 (135 μ M) y un exceso de cinco veces de los péptidos (225 μ M). A 2 μ l de esta mezcla se le añadió 1 μ l de la solución precipitante formada por 0.8 M sulfato amónico y 0.1 M MES pH 6.0. Los cristales con forma oval a partir de los que se determinó la estructura surgieron después de tres días y se congelaron en nitrógeno líquido usando 25% de etilenglicol como crioprotector.

3.4.3. Colecta y procesamiento de los datos de difracción

Una vez que los cristales alcanzan un tamaño suficiente para ser pescados de las gotas de cristalización, se pueden analizar por difracción de rayos X. El objetivo principal de este proceso es el de coleccionar patrones de difracción en diferentes posiciones angulares. Para ello, con la ayuda de un goniómetro el cristal debe ser rotado en ángulos pequeños, típicamente de 0.1°, con el fin de coleccionar todas las reflexiones de Bragg sin que se superpongan unas con otras. En este trabajo la colecta de los cristales se realizó en fuentes sincrotrón de alta energía. Los datos de difracción fueron coleccionados en el sincrotrón Diamond Light Source (Didcot, Reino Unido) en las líneas I04 y I24 y en el sincrotrón ALBA (Barcelona, España) en la línea XALOC.

Para procesar el conjunto de reflexiones obtenidas en las diferentes posiciones angulares de un cristal es necesario seguir una serie de pasos. En primer lugar, se determina el grupo espacial y el tamaño de la celda unidad a partir de las distancias entre las reflexiones. En segundo lugar, en el proceso de indexado se asignan los índices de miller (h,k,l) a cada reflexión para un grupo espacial dado. El siguiente paso, es el proceso de integración en el que se define la intensidad (I) de cada reflexión. Posteriormente, la lista de reflexiones de cada patrón de difracción se combina con el conjunto total de imágenes y se normalizan en una escala absoluta en función de su intensidad. Esta etapa se denomina escalado. Finalmente, con estos datos se realizan una serie de estadísticas que permiten confirmar el grupo espacial y los límites de resolución del cristal. Existen diferentes programas informáticos que realizan los diferentes pasos de este proceso. En este trabajo se utilizó el programa XDS (124).

3.4.4. Determinación estructural

Para extraer la información estructural de macromoléculas a partir de los datos de difracción es necesario calcular la amplitud y la fase de las ondas dispersadas. Sin embargo, del patrón de difracción solo se puede extraer de manera directa la amplitud, relacionada con las intensidades, mientras que la fase, $\alpha(hkl)$, debe ser calculada mediante métodos indirectos. El problema de las fases puede resolverse mediante diferentes métodos como el reemplazamiento molecular, el reemplazamiento isomorfo o la introducción de dispersores anómalos.

Para calcular las fases mediante el método de reemplazamiento molecular es necesario que la proteína en estudio tenga una secuencia de aminoácidos homóloga o posea un plegamiento similar al de otra proteína, de la cual se conoce su estructura. Este método se basa en el posicionamiento del modelo estructural de la proteína conocida en el empaquetamiento cristalino de la proteína en estudio. Para ello, es necesario superponer los vectores de Patterson de la molécula conocida con los de la nueva proteína mediante operaciones de rotación y traslación (125). Una vez se ha determinado de manera correcta su orientación y posición en la celda unidad, se pueden calcular los factores de

estructura de la proteína en estudio utilizando las fases calculadas y las amplitudes obtenidas experimentalmente.

Por su parte, cuando no existe un modelo similar disponible, el cálculo de las fases puede realizarse mediante el método del reemplazamiento isomorfo o introduciendo dispersores anómalos. El reemplazamiento isomorfo se basa en la utilización de átomos que poseen un gran número de electrones, los cuales provocan una gran dispersión de los rayos X. Este tipo de átomos deben introducirse en el cristal de modo que no afecten la estructura de la proteína nativa. Existen diferentes formas de conseguir el reemplazamiento isomorfo como pueden ser la difusión de átomos pesados a través de los canales de solvente del cristal o mediante su coordinación con las cadenas laterales de ciertos aminoácidos. Sin embargo, la parte fundamental de esta técnica es que se mantenga el isomorfismo, es decir, que tras su incorporación el cristal conserve la misma posición de los átomos en la celda unidad que la que tenía el cristal nativo. Dándose esta asunción, los átomos pesados pueden llegar a causar diferencias significativas en las intensidades del patrón de difracción del cristal derivado en comparación con el del nativo. Estas diferencias pueden ser usadas para calcular la posición relativa de los átomos pesados y las fases de los haces difractados por la proteína. Si únicamente se utiliza un cristal derivado y uno nativo la técnica se denomina reemplazamiento isomorfo simple (SIR), mientras que si se utiliza más de un derivado de átomo pesado en el cristal de proteína se denomina reemplazamiento isomorfo múltiple (MIR).

La incorporación de dispersores anómalos es un método análogo al del reemplazamiento isomorfo. Esta técnica se basa en la modificación de las propiedades físicas de los átomos para provocar cambios apreciables en las intensidades de difracción. En la actualidad la forma más común para incorporar un dispersor anómalo es sustituyendo los átomos de azufre de las metioninas por selenio. La introducción de este átomo rompe la Ley de Friedel y por tanto, la intensidad de las reflexiones h,k,l y $-h,-k,-l$ dejan de ser iguales, permitiendo determinar su posición. Conociendo las posiciones de los átomos introducidos se puede calcular los factores de estructura y las fases. Para la adquisición de los

datos de difracción de los cristales derivados se pueden utilizar dos métodos distintos basados en el número de longitudes de onda usadas durante la colecta. Por un lado, está el método de dispersión anómala de longitud de onda única (SAD), en el cual únicamente se utiliza la longitud de onda correspondiente al máximo de dispersión del átomo introducido. Por otro, en el método de dispersión anómala de longitud de onda múltiple (MAD) se utilizan las longitudes de onda correspondientes al máximo de dispersión, el punto de inflexión de la curva de absorción (donde el efecto dispersivo es mínimo) y la longitud de onda remota al punto de absorción máxima. La adquisición de datos de difracción a partir de un mismo cristal favorece el isomorfismo, permitiendo la resolución de estructuras a partir de un único cristal.

El cálculo de las fases a partir de estos métodos junto con las amplitudes experimentales observadas proporciona un mapa preliminar de la densidad electrónica de las moléculas cristalizadas. Sin embargo, las fases iniciales deben ser mejoradas para obtener las características estructurales. Este proceso de mejora se denomina refinamiento de las fases y se resume en una serie de pasos cíclicos que van añadiendo información adicional al mapa de densidad electrónica para permitir la construcción del modelo estructural.

En este trabajo la determinación estructural de RidL₁₋₈₆₆ se realizó utilizando la combinación de los métodos de dispersión anómala y reemplazamiento molecular. Para ello, se utilizó selenometionina como dispersor anómalo y se colectaron los datos de difracción mediante el método de dispersión de onda única (SAD). Inicialmente, a través del programa SHELX (126) se posicionaron 40 de los 52 selenios esperados. A pesar de que a partir del mapa de densidad electrónica obtenido se pudo identificar la presencia de α -hélices y construir un modelo inicial, esta solución no pudo ser refinada. Esto se debió a la presencia de simetría no cristalográfica (NCS). Para determinar el operador de simetría no cristalográfica se inspeccionaron nuevamente las posiciones de los selenios y se seleccionaron cuatro conjuntos de cinco átomos cada uno con distancias interatómicas consistentes. A partir de uno de estos conjuntos se calculó el operador de NCS mediante el programa LSQKAB (127) y se aplicó en el cálculo

de las fases en SHELX junto a la solución parcial conseguida anteriormente. Las fases obtenidas se utilizaron para refinar la solución parcial en REFMAC5 (128). La visualización de los resultados obtenidos en COOT (129) permitió la identificación de tres dominios distintos en cada monómero, los cuales estaban relacionados con sus homólogos en los otros monómeros por un operador de NCS diferente. Sin embargo, la superposición de los mapas calculados de cada dominio fue suficiente para determinar la dirección de las hélices y asignar la secuencia del dominio intermedio. En paralelo, se resolvió la estructura del complejo RidL₁₋₂₃₆-VPS29-VPS35C mediante SAD combinando la señal anómala obtenida de dos cristales distintos (uno en el que VPS29-VPS35C fue marcado con selenometionina y otro en el que el marcado fue RidL₁₋₂₃₆) con el método del reemplazamiento molecular, utilizando como modelo de búsqueda la estructura del complejo VPS29-VPS35C (código PDB: 2R17). Inicialmente, la estructura del complejo VPS29-VPS35C fue posicionada mediante el programa PHASER (130), obteniéndose un modelo parcial compuesto por tres copias de ese complejo. Este modelo se combinó con la señal anómala de ambos cristales para su faseamiento mediante autoSHARP (131). La solución obtenida consistió en cuatro copias de VPS29-VPS35C y cuatro monómeros de RidL₁₋₂₃₆, los cuales fueron construidos manualmente sobre la densidad electrónica y refinados, utilizando COOT y REFMAC5. Para asignar la secuencia de RidL₁₋₂₃₆ se utilizó la señal anómala obtenida y el programa para combinar múltiples cristales DMMULTI (132). La asignación de su secuencia se utilizó para completar la región N-terminal de RidL₁₋₈₆₆, permitiendo posteriormente determinar la de su extremo C-terminal mediante ciclos de refinamiento en REFMAC5.

La estructura del complejo VPS29-VPS35C-RidL_{loop} se resolvió mediante el método de reemplazamiento molecular en PHASER utilizando la estructura del complejo VPS29-VPS35C (código PDB: 2R17) como modelo de búsqueda. En su unidad asimétrica se encontraron cuatro copias de VPS29-VPS35C, cada una de ellas unida a una molécula de RidL_{loop}. La secuencia del péptido se construyó manualmente en COOT mediante ciclos interactivos de refinamiento en REFMAC5.

Finalmente, las estructuras de los complejos VPS26-VPS35N-SNX3-APP₇₃₉₋₇₅₂ y VPS26-VPS35N-SNX3-BACE₄₈₀₋₅₀₂ se resolvieron usando el método de reemplazamiento molecular, utilizando como modelo de búsqueda la estructura de VPS26-VPS35N-SNX3 (código pdb: 5F0J). La unidad asimétrica en ambos complejos estuvo formada por una única copia. La secuencia de los péptidos se construyó manualmente a través de COOT y REFMAC5 usando selenometionina como marcador de posición.

3.4.5. Validación de la estructura

La construcción del modelo estructural que representa la densidad electrónica ha de pasar numerosos controles de calidad que permitan evaluar su exactitud con respecto a los datos experimentales obtenidos. Uno de los indicadores principales de la correcta distribución de los átomos en el espacio es el R_{factor} (ecuación 12). Este parámetro puede conllevar cierta inexactitud por lo que va acompañado de un valor complementario denominado R_{free} (ecuación 13), en el que un conjunto de reflexiones es excluido en el proceso de refinamiento. Además de estos parámetros, también existen una serie de valores estereoquímicos que también deben respetarse como las distancias y ángulos de enlace, que se expresan en función de la desviación cuadrática media (r.m.s.d) respecto a unos valores ideales y el gráfico de Ramachandran, en el cual se representan las combinaciones energéticamente permitidas para los aminoácidos de una proteína así como las distancias entre residuos.

$$R_{factor} = \frac{\sum F_{obs} - F_{calc}}{\sum F_{obs}} \quad \text{ecuación 12}$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in free} F_{obs} - F_{calc}}{\sum_{hkl \in free} F_{obs}} \quad \text{ecuación 13}$$

En este trabajo la validación del modelo se realizó mediante el uso de los programas COOT, REFMAC5.

3.5. Alineamientos de secuencia

Para determinar el grado de similitud e identificar los residuos conservados entre diferentes proteínas se realizaron alineamientos de secuencia utilizando el servidor Clustal Omega desarrollado por el Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (<https://www.ebi.ac.uk>). Los resultados obtenidos se representaron mediante el servidor ESPrict (<https://esprict.ibcp.fr/ESPrict>).

3.6. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica basada en la diferencia de absorción de los componentes de la luz polarizada circular por una molécula. La luz polarizada circular puede describirse como el sumatorio de una onda polarizada circular derecha (E_D) y una onda polarizada circular izquierda (E_L). Las proteínas, al ser moléculas quirales, provocan la refringencia de los componentes del haz de luz polarizada un cierto ángulo dependiendo de la organización de sus enlaces peptídicos. El dicroísmo circular mide las diferencias de absorción de los componentes de la luz polarizada circular, E_D y E_L , para proporcionar una estimación de la estructura secundaria de la proteína (133). La diferencia de absorción entre los dos componentes de la luz polarizada circular se denomina elipticidad (θ).

En este trabajo, los espectros de dicroísmo circular se adquirieron a 25°C utilizando un espectropolarizador Jasco 710/810. Los datos se colectaron entre 200 y 250 nm de longitud de onda usando una cubeta de 0.1 cm de longitud de trayectoria. Como paso previo, todas las proteínas fueron dializadas durante 18 horas a 4°C frente a 50 mM HEPES 7.5, 150 mM NaCl y 0.5 mM TCEP y diluidas con el buffer a una concentración de 30 μ M. Para la representación de las curvas, la elipticidad se convirtió en elipticidad molar por residuo utilizando la siguiente fórmula (ecuación 14).

$$\theta MRE = \frac{\theta}{10 \cdot L \cdot C \cdot (n-1)} \quad \text{ecuación 14}$$

donde L (longitud en cm)=0.1; C = concentración (M); $(n-1)$ = n° enlaces peptídicos

3.7. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica que permite cuantificar la energía de reacción entre moléculas para calcular los parámetros termodinámicos de la interacción. Se basa en un sistema adiabático en el que el calor que se desprende o se absorbe durante la reacción es compensado por el núcleo térmico para mantener la celda de referencia y la celda que contiene la muestra exactamente a la misma temperatura (134). Para ello, uno de reactivos (ligando) se carga en un dispositivo de inyección y se añade, en pequeñas cantidades, sobre la celda que contiene la otra molécula. Entre cada inyección, la temperatura de las celdas se iguala y la línea base vuelve a su posición inicial. La reducción o incremento de la energía aplicada por el núcleo térmico en cada inyección se representa en un gráfico (isoterma) respecto a la relación molar de ligando y proteína de la celda. La estequiometría de la reacción (n), la constante de disociación (K_d) así como la variación de la entalpía (ΔH) y la variación de la entropía (ΔS) se pueden calcular directamente a partir de la isoterma obtenida. La relación molar en el centro de la isoterma nos indica la estequiometría de la reacción. El ajuste de la curva a un modelo de enlace nos proporciona la constante de disociación, mientras que la cantidad de energía liberada por mol de ligando nos permite calcular ΔH y ΔS . A partir de estos parámetros se puede calcular la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG), utilizando la siguiente fórmula (ecuación 15).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{ecuación 15}$$

donde T es la temperatura en kelvin

Las medidas de ITC realizadas en este trabajo se llevaron a cabo a 25°C en un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal). Antes de cada experimento, las proteínas fueron dializadas durante 18 horas en buffer compuesto por 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, y desgasificadas durante 5 minutos utilizando un desgasificador ThermoVac. Cada experimento, incluyó una inyección inicial de 2 µl, la cual no fue usada en el ajuste de los datos, seguida de 27 inyecciones de 10 µl con un espaciado de 360 segundos entre ellas. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Origin ITC, desarrollado por MicroCal. El ajuste teórico de la isoterma se realizó mediante el modelo de análisis de un único sitio de unión (“one set of sites”). Para las medidas de ITC entre RidL y el retrómero, se inyectaron 80-110 µM de RidL sobre la celda de muestra que contenía 9-11 µM de las diferentes subunidades del retrómero (VPS26-VPS29-VPS35, VPS29-VPS35C, VPS29). El análisis de la interacción de RidL con los diferentes mutantes puntuales del retrómero y VPS29 se realizó titrando 100-120 µM de RidL sobre 10 µM de los diferentes mutantes (Y165A, Y163A, L152E, VPS26-VPS29_{Y163A}-VPS35, VPS26-VPS29_{Y165A}-VPS35). Para el estudio de la interacción de RidL_{ΔL}, RidL_{Y166A} y RidL_{L170D} con VPS29, se inyectó 150 µM de las diferentes formas de RidL sobre 10 µM de VPS29. Para analizar la unión de TBC1D5_{TBC} con el retrómero, se inyectaron alícuotas de 220 µM de TBC1D5_{TBC} sobre 9-12 µM de las diferentes subunidades y mutantes puntuales del retrómero (VPS26-VPS29-VPS35, VPS26-VPS29_{Y163A}-VPS35, VPS26-VPS29_{Y165A}-VPS35, VPS29, VPS29_{Y165A}, VPS29_{Y163A}, VPS29_{L152E}). La interacción entre VARPc y las diferentes subunidades y mutantes puntuales del retrómero se cuantificó titrando 140-150 µM de VARPc sobre 10 µM de las diferentes variantes del retrómero. Los datos mostrados representan la media de un mínimo de tres medidas independientes realizadas para cada experimento. Para analizar la unión de FAM21-R2021 y FAM21-R21 y sus diferentes mutantes puntuales, se inyectaron 250 µM de estas proteínas sobre 10 µM de retrómero, VPS29-VPS35C, VPS35N, VPS35C y VPS29. Finalmente, la afinidad de VPS35 y VPS35_{D620N} con VPS29 se cuantificó añadiendo 90 µM de VPS35 y VPS35_{D620N} a 10 µM de VPS29.

3.8. Dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS)

La dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) es una técnica estructural que permite determinar, en una escala de nanómetros, el tamaño, la forma y la estructura interna de una partícula en solución. De la misma forma que en la cristalografía de rayos X, el principio físico en el que se basa esta técnica es la dispersión de los rayos X al incidir sobre una muestra monodispersa. Sin embargo, en SAXS la muestra irradiada se encuentra en solución lo que resulta en una dispersión difusa de los rayos X alrededor de las posiciones de las reflexiones de Bragg. Debido a este fenómeno, la información estructural a partir de las medidas de SAXS se extrae de la diferencia entre la densidad electrónica calculada para el solvente y la densidad electrónica del soluto (partícula en estudio). Por tanto, pequeñas diferencias en la composición del solvente o en la concentración del soluto pueden afectar significativamente a los datos de SAXS.

Los datos de dispersión son recogidos en un detector bidimensional y se representan en una curva de dispersión en la que el logaritmo de la intensidad ($\log I$) se grafica frente a la transferencia del momento (s). La transformada de Fourier de la curva de dispersión permite calcular la distribución de distancias (P_r), a partir de la cual se deriva la masa molecular, el radio de giro (R_g), el volumen de exclusión (V), la distancia interatómica máxima (D_{max}), así como la forma tridimensional de la partícula.

Las medidas de SAXS del complejo formado por RidL₁₋₈₆₆ y VPS29-VPS35C se realizaron en la línea B21 del sincrotrón Diamond Light Source (Didcot, Reino Unido). Los datos de dispersión fueron recogidos en un detector Pilatus 2M. 45 μ l de muestra a una concentración de 6 mg/ml se inyectaron en una columna Shodex KW403-4F equilibrada en buffer E a un flujo de 0.25 ml/min, usando un HPLC Agilent 1200 series. El procesamiento inicial de los datos se realizó utilizando el programa ScAtter (versión 3.0), desarrollado por Robert P. Rambo. Las muestras del complejo RidL₁₋₄₂₀-retrómero fueron colectadas siguiendo el modo de flujo del cambiador de muestras automatizado en la línea BM29 del ESRF (Grenoble) utilizando un detector Pilatus 1M. El tratamiento inicial de los

datos de dispersión se llevó a cabo mediante el programa BsxCuBE. El procesamiento posterior se realizó utilizando el paquete de programas ATSAS (GNOM, DAMMIF, DAMMIN, DAMAVER, DAMFILT, DAMSTART) (135). Para la creación de los modelos estructurales, inicialmente se generaron 60 modelos *ab initio* independientes mediante DAMMIF. Estos modelos se superpusieron y filtraron para generar 10 modelos representativos utilizando los programas DAMAVER y DAMFILT, respectivamente. Los 10 modelos seleccionados se refinaron con DAMMIN, para crear un modelo preliminar de la envuelta. Para el complejo RidL₁₋₈₆₆-VPS29-VPS35C se obtuvo un mapa compacto formado por 549 átomos ficticios, mientras que el mapa del complejo RidL₁₋₄₂₀-retrómero estuvo constituido por 486 átomos ficticios. Para su validación, las estructuras de RidL₁₋₈₆₆, VPS29-VPS35C (código PDB: 2R17) y VPS26-VPS35N (código PDB: 5F0J) se superpusieron sobre los modelos creados con los datos de SAXS, utilizando el programa CHIMERA (136). El valor de ajuste “fitting” de los modelos estructurales sobre los datos experimentales (X^2) se calculó utilizando el programa FoXS (137).

3.9. Cromatografía de exclusión de tamaño con dispersión de luz multiangular (SEC-MALS)

La cromatografía de exclusión de tamaño con dispersión de luz multiangular (SEC-MALS) permite caracterizar el tamaño y la forma (estado oligomérico) de las proteínas en solución de manera precisa. En este tipo de experimentos, la muestra de macromoléculas en suspensión que atraviesa la columna es irradiada con una fuente de luz polarizada (laser). La dispersión de la luz incidente es monitorizada de manera continua para generar un gráfico (cromatograma) en el que los diferentes picos se corresponden con los componentes de la muestra inyectada. Los diferentes componentes de la muestra son transportados a través de la columna a diferentes velocidades en función de su tamaño, permitiendo su separación. La intensidad general de la dispersión permite estimar la masa molecular, mientras que el índice de refracción respecto al plano horizontal indica el tamaño.

En este trabajo, las medidas de SEC-MALS se realizaron en el sincrotrón Diamond Light Source (Didcot, Reino Unido) utilizando un HPLC (Agilent 1200 Series) en línea con una columna Shodex KW403-4F. Las muestras purificadas (45 μ l) se inyectaron a una concentración de 6-10 mg/ml. Antes de la inyección de las muestras, la columna se equilibró con cada uno de los tampones ensayados, los cuales se distinguieron únicamente por su concentración de sal (25 mM Tris pH 7.5, 150/300 mM NaCl y 0.5 mM TCEP). Las fracciones de elución se monitorizaron de forma continua mediante un detector DAWN HELEOS II MALS (Wyatt Technology) seguido por un detector de índice de refracción Optilab T-rEX (Wyatt Technology). La determinación de la masa molecular de cada pico individual se realizó con el programa ASTRA 6 (Wyatt Technology). Para la normalización de la dispersión de la luz incidente y como control de calidad se realizó una calibración estándar con albúmina de suero bovino (Sigma).

3.10. Técnicas en colaboración

Los métodos descritos a continuación fueron desarrollados en el laboratorio del Dr. Juan S. Bonifacino del Cell Biology and Neurobiology Branch, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NIH, Bethesda, USA). Estas técnicas no fueron directamente realizadas por el candidato a doctor pero son de gran relevancia en este trabajo.

3.10.1. Transfección y cultivos de células de mamífero

Las células utilizadas en los ensayos *in vivo* fueron células HeLa, las cuales se crecieron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ sobre medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y los antibióticos penicilina (100 U/ml) y streptomycin (100 μ g/ml). Para la transfección, las células se sembraron en placas de 6 pocillos de 1.5 cm de espesor y se dejaron crecer durante 24 horas en medio DNEM. Pasado ese tiempo, las células fueron transfectadas usando Lipofectamina 2000 (ThermoFisher), siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.10.2. Silenciamiento

Para la transfección de los siRNA, los pocillos de la placa se cubrieron con una solución de 1.5 ml que contenía 1×10^5 células HeLa, 1.25 ml de lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen) y 63 pmoles de siRNA frente a VPS35 (CAGAATTGCCCTTAAGACTTT, Qiagen siRNA oligo) o siRNA control (siRNA SMARTpool mixture, Dhamarcon). Después de 4-6 horas, se descartó el medio y se sustituyó por medio fresco sin lipofectamina y sin siRNA. Pasadas 48 horas, se transfectó el plásmido GFP-RidL₁₋₂₃₆ usando lipofectamina 2000. Antes de fijar las células en los portaobjetos (24 horas después), se lavaron con PBS 1X e incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

3.10.3. Microscopía de fluorescencia

Para los ensayos de microscopía de fluorescencia, las células fueron fijadas en PBS suplementado con 2% de formaldehído 24 horas después de ser transfectadas. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se dejaron incubando 1 hora en PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino. Pasado este tiempo, las células se montaron sobre un portaobjetos de vidrio usando Fluoromount-G (SouthernBiotech) como medio de montaje y se sellaron con esmalte de uñas. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal Zeiss 880 (con el objetivo de 63 aumentos, 1.4 NA PlanApo). Las imágenes fueron procesadas con los programas ImageJ y Adobe Illustrator. Todas las barras de escala representan 5 μ M.

Los ensayos de colocalización se realizaron utilizando el complemento de correlación de Pearson desarrollado para el programa ImageJ. Los diagramas de dispersión de colocalización indican el valor de correlación de Pearson, que representa la relación de la intensidad de señal de los canales verde y rojo de las imágenes analizadas. Este valor puede variar entre -1 y +1, donde 0 indica que no hay relación y -1 y +1 indican fuertes correlaciones negativas y positivas, respectivamente. En estos experimento, se estableció un nivel umbral de 10, bajo el cual los valores de señal se consideraron ruido y por tanto no se incluyeron en el análisis estadístico.

3.10.4. Western blot

Para los ensayos de Western blot las células HeLa se transfectaron con los plásmidos que codifican GFP-RidL₁₋₂₃₆ o GFP-RidL_{1-236, ΔL}, en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, se retiró el medio y se extrajeron las células en 1 ml de PBS con la ayuda de un elevador de células. La sedimentación se realizó mediante centrifugación durante 10 min. a 4500 rpm en tubos de microcentrífuga. Los sedimentos celulares se lisaron en 100 μl de tampón de muestra Laemmli 1X (BioRad), se desnaturalizaron a 95°C durante 10 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10% para su transferencia a membranas PVDF. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-GFP o anti-GAPDH a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS antes de ser visualizadas en un sistema de documentación digital. La transferencia se desarrolló utilizando el sustrato Super Femto West Femto (ThermoFisher).

Resultados

4. Resultados

4.1. Análisis a nivel atómico y funcional de la interacción entre el efector de *Legionella pneumophila*, RidL con el retrómero

4.1.1. La región N-terminal de RidL participa en la interacción con el retrómero

RidL es un efector de *Legionella pneumophila* de 1167 aminoácidos que es translocado al citosol de la célula hospedadora. Al igual que una gran parte de los efectores de *Legionella pneumophila*, carece de homología de secuencia con otras proteínas. Su baja similitud con proteínas implicadas en funciones conocidas impidió la identificación de sus dominios funcionales a través de alineamientos de secuencia. Por este motivo, se decidió iniciar el estudio de las bases moleculares que rigen su asociación con el retrómero, identificando experimentalmente la región de RidL implicada en esta interacción. Para ello, mediante la ayuda del servidor de predicción de estructura secundaria Phyre2, se diseñaron y purificaron diferentes constructos de RidL (fig. 11A-B) y se analizó su capacidad para unirse al subcomplejo estable del retrómero formado por VPS29 y la región C-terminal de VPS35 (aminoácidos 476-780). A través de ensayos “pull-down”, se observó que únicamente los constructos de RidL que contienen los aminoácidos comprendidos entre el 30 y el 236 fueron capaces de interactuar con el retrómero para formar un complejo estable (fig. 11C). A diferencia de estos constructos, los fragmentos de RidL formados por la región central (RidL₁₆₇₋₈₆₆) o por el extremo C-terminal (RidL₈₆₆₋₁₁₆₇) no se unieron al retrómero (Fig. 11C). Todos estos fragmentos fueron solubles y con un tamaño acorde al esperado (fig. 11B), indicando que la ausencia de interacción de los constructos de RidL anteriormente mencionados derivó de su incapacidad para unirse al retrómero y no debido a un plegamiento incorrecto.

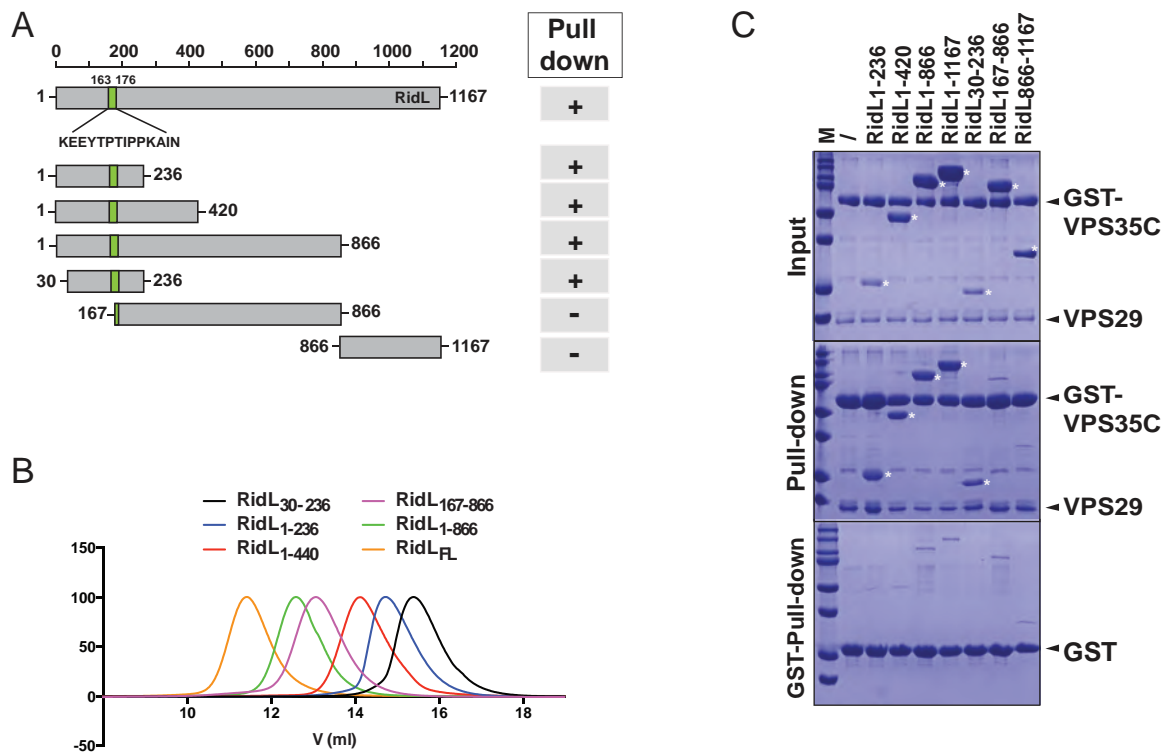


Figura 11. La región N-terminal de RidL interacciona con el retrómero a través del fragmento comprendido entre los aminoácidos 30 y 236. (A) Representación esquemática de los diferentes constructos de RidL usados en el experimento. El loop encargado de la interacción aparece marcado en color verde. El (+) y el (-) colocado a la derecha indica la capacidad o no de los constructos de formar complejo con el retrómero. (B) Cromatograma final de la purificación de cada uno de los diferentes constructos de RidL. (C) Ensayo “pull-down” de los diferentes fragmentos de RidL con VPS29-(GST-VPS35C). Los geles SDS/PAGE fueron visualizados mediante tinción con azul de Coomassie. El panel superior muestra el “input” o mezcla inicial de las proteínas, el panel central las proteínas unidas a la resina una vez ha sido incubada con VPS29-(GST-VPS35C) y los constructos de RidL indicados en cada una de las calles y el panel inferior las proteínas unidas inespecíficamente a la etiqueta de GST utilizada para inmovilizar las muestras a la resina. La posición de las proteínas se indica a la derecha del panel. Las bandas correspondientes a los constructos de RidL aparecen marcadas con un asterisco blanco.

Este mismo resultado fue observado mediante cromatografía líquida de exclusión de tamaño donde tanto la forma nativa de RidL como su extremo N-terminal (RidL₁₋₂₃₆) coeluyeron formando un complejo estable con el retrómero (fig. 12A-C). En cambio, la región central (RidL₁₆₇₋₈₆₆) migró de forma separada (fig. 12D) indicando nuevamente que la región N-terminal de RidL, localizada entre los residuos 30 y 236, es clave en la unión al retrómero.

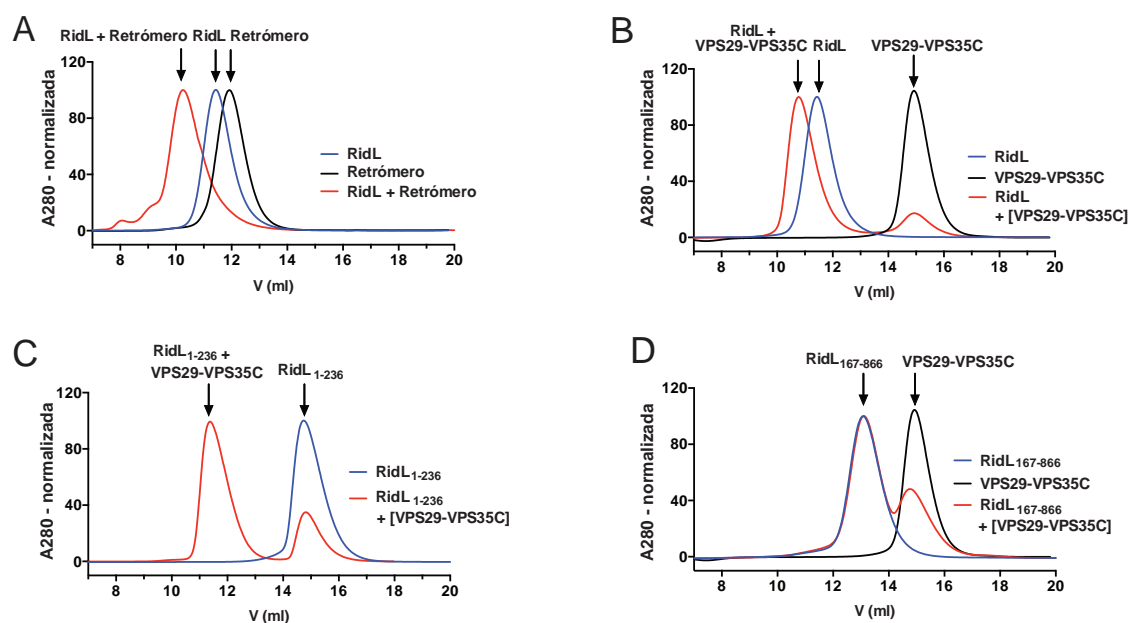


Figura 12. Análisis mediante cromatografía de filtración en gel de los complejos formados por RidL y retrómero. En los cromatogramas de (A) RidL y retrómero, (B) RidL y VPS29-VPS35C, (C) RidL₁₋₂₃₆ y VPS29-VPS35C y (D) RidL₁₆₇₋₈₆₆ y VPS29-VPS35C, la señal de absorbancia a 280nm normalizada fue representada frente al volumen de elución (ml). El volumen de elución de las proteínas se indica con una flecha encima de cada pico.

A pesar de que hemos demostrado que la unión de RidL con el retrómero se da principalmente a través de sus primeros 236 residuos, RidL es una proteína de 1167 aminoácidos por lo que, debido a su longitud, podría existir alguna otra región que contribuya parcialmente a esta interacción. En consecuencia con este planteamiento, se comparó la afinidad de unión (K_d) al retrómero de RidL con la de su fragmento N-terminal (residuos 30 a 236), mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Los parámetros termodinámicos obtenidos con el fragmento N-terminal de RidL fueron muy similares a los de su forma nativa, presentando una constante de disociación (K_d) de 151 ± 13 nM en el caso de RidL y de 164 ± 9 nM en el caso de RidL₃₀₋₂₃₆ (fig. 13A-B). Ambos valores de K_d se encuentran en el mismo rango, indicando que la unión de RidL al retrómero se da principalmente a través de su extremo N-terminal y que no existen otras regiones que contribuyan de manera importante en la interacción.

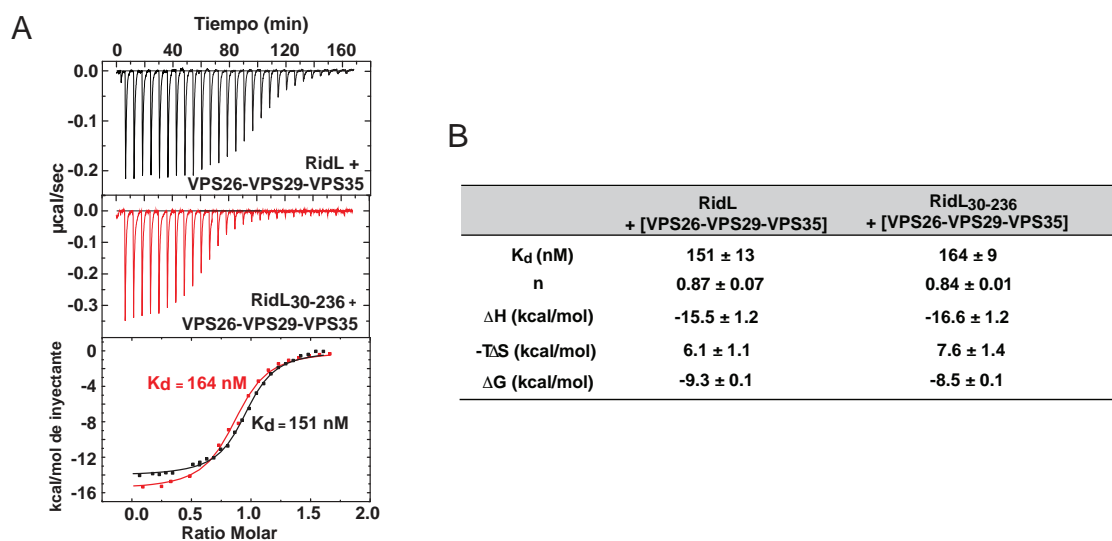


Figura 13. El fragmento N-terminal de RidL es el único implicado en la interacción con retrómero. (A) Isotherma de la calorimetría de titulación de RidL (negro) o RidL₃₀₋₂₃₆ (rojo) frente a retrómero. La afinidad de la unión, expresada por la constante de disociación (K_d) se indica en el panel derecho. (B) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas. La constante de disociación (K_d), la estequiometría de la reacción (n), la variación de la entalpía (ΔH), la variación de la entropía ($-\Delta S$) y la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG) fueron calculadas a partir de un mínimo de tres réplicas para cada uno de los experimentos realizados. Los valores indicados representan la media y la desviación estándar.

4.1.2. RidL interacciona con el retrómero a través de VPS29

Una vez identificada la región de RidL implicada en la unión al retrómero se estudió que subunidad o subunidades del retrómero participan en la interacción. Con anterioridad a la realización de este trabajo, otros autores caracterizaron de forma parcial la interacción entre RidL y retrómero (119). Mediante ensayos de coinmunoprecipitación, Finsel *et al.* identificaron la subunidad VPS29 asociada a RidL, sin embargo, la subunidad VPS35 no fue incluida en estos experimentos. Por este motivo, se decidió analizar experimentalmente si la interacción de RidL ocurre principalmente o exclusivamente a través de VPS29. Para ello, se calculó la afinidad de RidL por cada uno de los diferentes subcomplejos del retrómero, mediante ITC. Las afinidades obtenidas de la titulación de RidL frente al retrómero ($K_d = 151$ nM), el subcomplejo estable formado por VPS29-VPS35C ($K_d = 151$ nM) y la subunidad monomérica VPS29 ($K_d = 181$ nM) fueron

prácticamente idénticas, no observándose diferencias significativas entre los valores calculados en cada experimento (fig. 14A-B). Este resultado está en concordancia con que VPS29 sea la única subunidad del retrómero requerida para formar un complejo estable con RidL. Adicionalmente, se observó por cromatografía de filtración en gel que la mezcla de ambas proteínas coeluye en las mismas fracciones (fig 14C-D). Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que la unión de RidL al retrómero ocurre exclusiva o principalmente a través de VPS29, de manera independiente del resto de subunidades del retrómero.

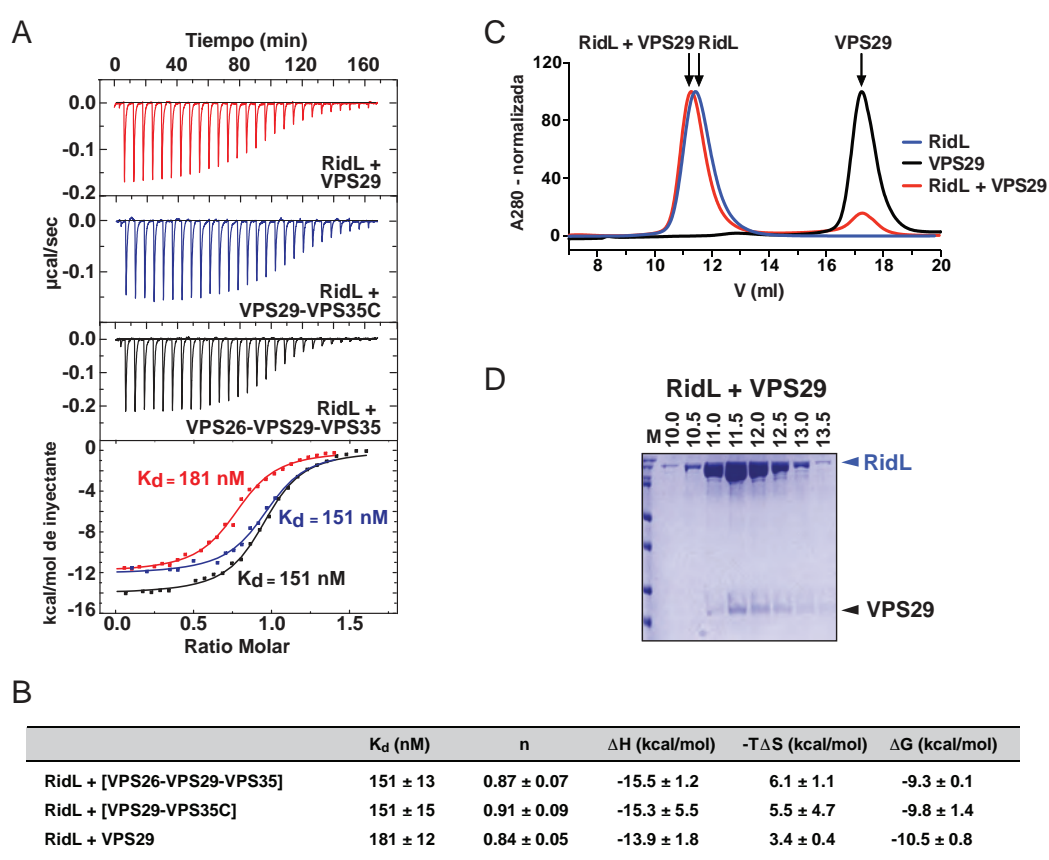


Figura 14. RidL interacta con el retrómero a través de VPS29. (A) Isotherma de la calorimetría de titulación de RidL frente a retrómero (negro), VPS29-VPS35C (azul) y VPS29 (rojo). (B) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas. (C) Cromatograma del complejo formado por RidL y VPS29 (rojo). Los cromatogramas de RidL (azul) y VPS29 (negro) también aparecen representados para permitir su comparación. (D) Gel SDS-PAGE de las fracciones correspondientes al complejo formado por RidL y VPS29.

4.1.3. Estructura cristalográfica de RidL₁₋₈₆₆

Para investigar en mayor detalle las bases moleculares que rigen la interacción de RidL con el retrómero se decidió utilizar la cristalografía de rayos X para caracterizar a nivel atómico el complejo formado por la unión de ambas proteínas. Inicialmente, se trató de cristalizar la mezcla del retrómero, el subcomplejo formado por VPS29-VPS35C o la subunidad monomérica VPS29 con los múltiples constructos de RidL diseñados (fig. 11A). A pesar de todos estos intentos, únicamente se obtuvieron cristales que no difractaron con la calidad suficiente como para resolver el complejo. Los mejores cristales obtenidos, formados por la unión de VPS29-VPS35C con el constructo RidL₁₋₂₃₆, difractaron a 4.3 Å de resolución (tabla 8). Sin embargo, aunque mediante reemplazamiento molecular, utilizando como modelo de búsqueda la estructura de VPS29-VPS35C (código PDB: 2R17), se pudo encontrar una solución, la densidad electrónica correspondiente a RidL₁₋₂₃₆ no permitió su modelado. La baja resolución obtenida y la falta de homología estructural de RidL con otras proteínas, impidió llevar a cabo los pasos de modelado y refinamiento necesarios para extraer la información estructural.

Por este motivo se optó por conseguir la estructura de RidL a mayor resolución para utilizarla, *a posteriori*, como modelo de búsqueda en la resolución del complejo RidL₁₋₂₃₆-VPS29-VPS35C anteriormente descrito. Nuevamente, se probaron todos los constructos disponibles de RidL para la obtención de cristales con buena calidad de difracción. El constructo RidL₁₋₈₆₆ fue el único de todos ellos a partir del cual se produjeron cristales nativos de calidad suficiente que difractaron hasta 3 Å de resolución (fig. 15B y tabla 7). Para calcular las fases y poder resolver su estructura fue necesario aplicar el método de dispersión anómala de longitud de onda única (SAD), utilizando la señal anómala derivada del Selenio. Con este fin, se purificó y cristalizó el constructo RidL₁₋₈₆₆ después de haber sido expresado en medio mínimo con selenometionina en sustitución de metionina (fig. 15A). Empleando como referencia la condición de cristalización donde crecieron los mejores cristales nativos, se obtuvieron cristales de la proteína derivatizada (fig. 15C). Estos cristales fueron adecuados para ser utilizados en experimentos de dispersión anómala de longitud de onda única, a

pesar de difractar a 4 Å de resolución (tabla 7). A partir de los datos de SAD obtenidos, se pudo calcular las fases de la proteína y combinarse con los datos nativos para resolver y refinar la estructura de RidL₁₋₈₆₆ a 3 Å de resolución.

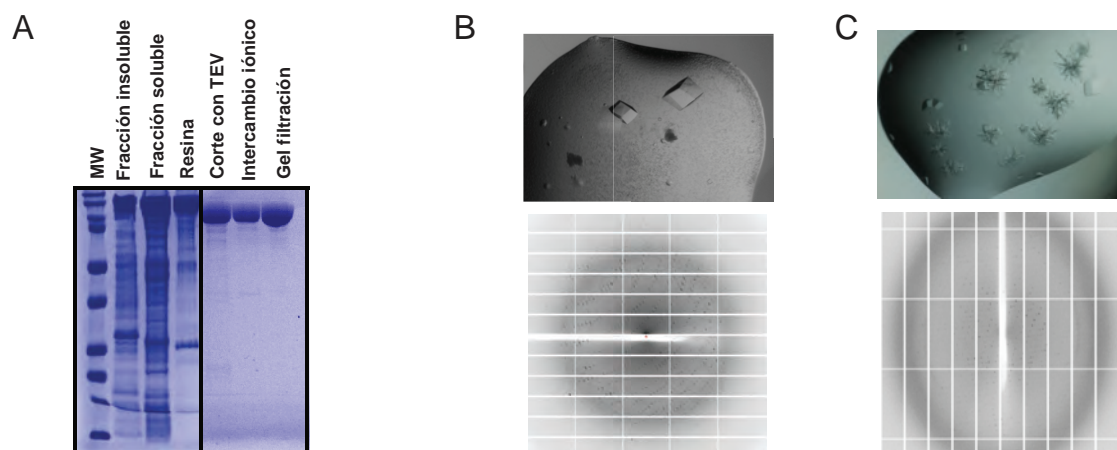


Figura 15. Derivatización de RidL₁₋₈₆₆ mediante el uso de selenio. (A) Purificación de la proteína con selenometionina en sustitución de metionina. (B) Cristales refinados de la proteína nativa en la solución precipitante (0.4 M NaF, 14-16% (w/v) polietilenglicol (PEG) 3350 y 0.1 M Bis-tris propano pH 7.5) y patrón de difracción obtenido a partir de uno de ellos. (C) Cristales refinados de la proteína derivatizada con selenometionina e imagen de difracción representativa del conjunto de datos utilizado para el faseamiento.

La estructura de RidL₁₋₈₆₆ está formada por 47 α -hélices que adoptan una disposición espacial en forma de S, conectadas por “loops” (lazos) de diferentes longitudes (fig. 16A). La densidad electrónica obtenida de los datos experimentales permitió el modelado de los residuos comprendidos entre el 1 y el 863. Los estudios de homología estructural realizados con diferentes servidores (BALBES y DALI server) confirmaron la falta de semejanza con otras proteínas de estructura conocida. También se realizaron búsquedas de diferentes regiones de RidL (fig. 16B) para la identificación de potenciales dominios funcionales. Desafortunadamente, ninguna de las alternativas de división realizadas permitió predecir potenciales funciones en base a su comparación con el total de proteínas depositadas en la base de datos PDB. Los valores de similitud más altos observados en estos servidores (< 0.13), se obtuvieron a partir del subdominio definido entre los residuos 712 y 866. Esta región está constituida por 3 α -hélices entrecruzadas y presenta un plegamiento

similar al de un dominio BAR. No obstante, a pesar de esta semejanza general los valores de identidad de secuencia fueron muy bajos, no superando el 13% en ningún caso.

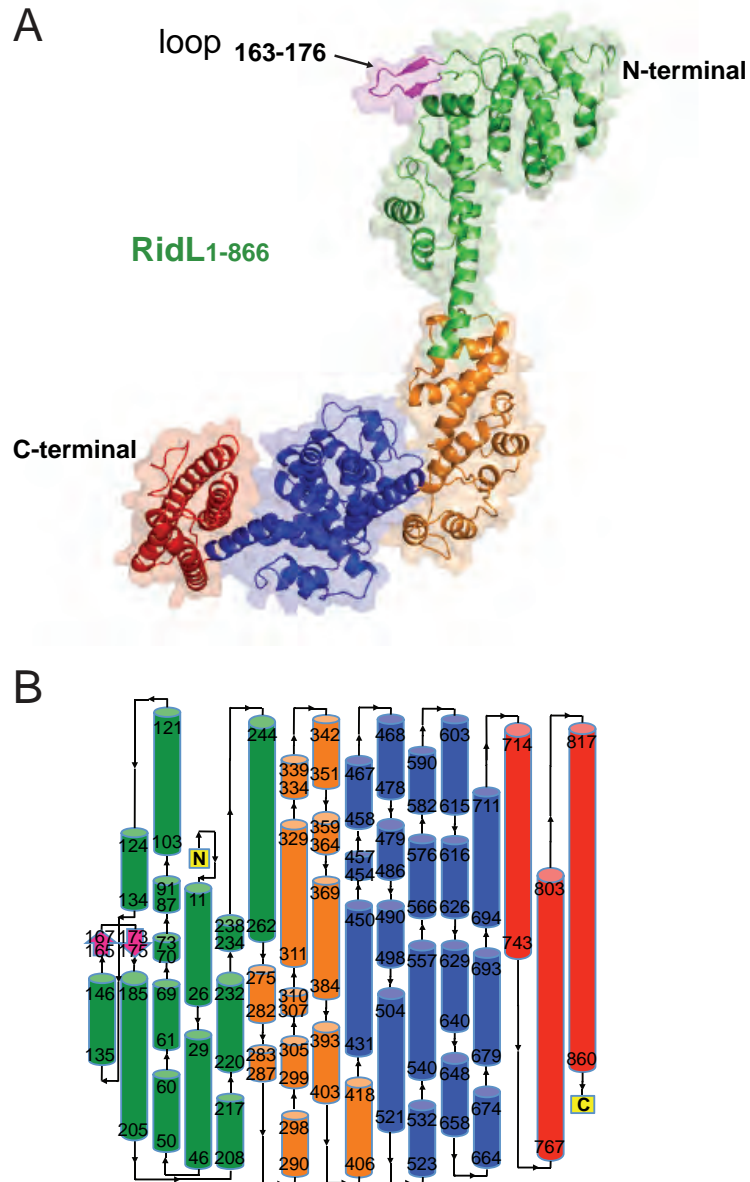


Figura 16. Estructura cristalográfica de RidL₁₋₈₆₆. (A) Representación general de la estructura de RidL₁₋₈₆₆ mediante diagramas de Richardson sobre su superficie y coloreada en base a posibles dominios estructurales identificados: residuos 6-262 (verde), residuos 263-429 (naranja), residuos 430-711 (azul), residuos 712-863 (rojo) y residuos 163-167 (magenta). El “loop” a través del cual tiene lugar la interacción con el retrómero aparece indicado con una flecha. (B) Mapa esquemático de RidL₁₋₈₆₆ coloreado como en A. Las α -hélices están representadas por medio de cilindros y el “hairpin loop” por flechas.

Tabla 7. Estadísticas de la colecta de datos y el refinamiento de RidL₁₋₈₆₆

	RidL ₁₋₈₆₆	RidL _{1-866, SeMet}
Colecta de datos		
Grupo espacial	C121	C121
Celda unidad		
a, b, c (Å)	242.7, 230.9, 86.7	243.2, 229.4, 87.0
α, β, γ (°)	90.0, 90.4, 90.0	90.0, 90.4, 90.0
Resolución	49.5 - 3.0 (3.19-3.0)	47.9 - 4.0 (4.16-4.0)
R _{meas}	0.10 (2.52)	0.18 (2.57)
CC _{1/2} (%)	99.9 (34.1)	99.8 (47.9)
I/ σ	12.6 (0.7)	7.9 (0.8)
Completeza (%)	99.0 (97.8)	100.0 (99.7)
Redundancia	7.0 (7.0)	7.0 (7.2)
Refinamiento		
Nº. reflexiones	95,143	
R _{work} / R _{free}	23.1/29.1	
Nº. átomos		
Proteína	26,232	
Iones	1	
Aguas		
Factor B		
Proteína	125.9	
Iones	166.2	
Longitud de enlace	0.0864	
Longitud de ángulo	1.54	
Código PDB	5OT4	

* La capa de mayor resolución se muestra entre paréntesis

** SeMet corresponde a la proteína derivatizada con Selenometionina

4.1.4. Estructura cristalográfica del complejo formado por RidL₁₋₂₃₆ y las subunidades del retrómero VPS29 y VPS35C

La estructura de RidL₁₋₈₆₆ (fig. 16) se utilizó para dar solución al conjunto de datos del complejo formado por RidL₁₋₂₃₆ y VPS29-VPS35C. La parte de RidL compuesta por los primeros 236 aminoácidos y la estructura del subcomplejo formado por VPS29-VPS35C (código PDB: 2R17) fueron utilizadas como modelos de búsqueda en el método de resolución estructural por reemplazamiento molecular. Pese a la baja resolución (4.3 Å), la estructura final del complejo presentó una excelente estereoquímica (98.8% de los residuos se encuentran en regiones favorables o permitidas del ramachandran) y un valor de “R-free” tras

el refinamiento de 29.4 (tabla 8). Además, para confirmar la asignación de las cadenas laterales, ambas partes del complejo se cristalizaron con selenometionina y la señal anómala se utilizó como marcador de posición (fig. 17A).

Tabla 8. Estadísticas de la colecta de datos y el refinamiento del complejo RidL₁₋₂₃₆-VPS29-VPS35C, así como del formado por RidL_{loop} y VPS29-VPS35C

	RidL ₁₋₂₃₆ , SeMet VPS29 VPS35	RidL ₁₋₂₃₆ VPS29 ^{SeMet} VPS35 ^{SeMet}	RidL _{loop} VPS29 VPS35
Colecta de datos			
Grupo espacial	P212121	P212121	P1211
Celda unidad			
a, b, c (Å)	90.2, 173.24, 445.77	90.0, 173.5, 447.5	58.6, 139.0, 126.6
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 92.8, 90.0
Resolución	49.5 - 4.3 (4.5-4.3)	47.9 - 4.6 (5.3-4.6)	49.9 - 2.5 (2.56-2.52)
R _{meas}	0.21 (4.52)	0.15 (2.30)	0.16 (1.13)
CC _{1/2} (%)	99.8 (31.8)	99.9 (44.3)	99.6 (48.8)
I/σ'	8.8 (0.7)	5.5 (0.8)	8.5 (1.9)
Completeza (%)	100 (100)	100.0 (99.7)	99.8 (99.7)
Redundancia	13.4 (13.9)	13.4 (14.0)	6.8 (6.8)
Refinamiento			
Nº. reflexiones	46155		64447
R _{work} /R _{free}	24.9/29.4		20.5/26.7
Nº. átomos			
Proteína	22276		15918
Ligando/iones			277/48
Aguas			226
Factor B			
Proteína	266.01		53.1
iones			78.7/59.8
Longitud de enlace	0.0106		0.008
Longitud de ángulo	1.37		1.23
Código PDB	5OSH		5OSI

* La capa de mayor resolución se muestra entre paréntesis

** SeMet corresponde a la proteína derivatizada con Selenometionina

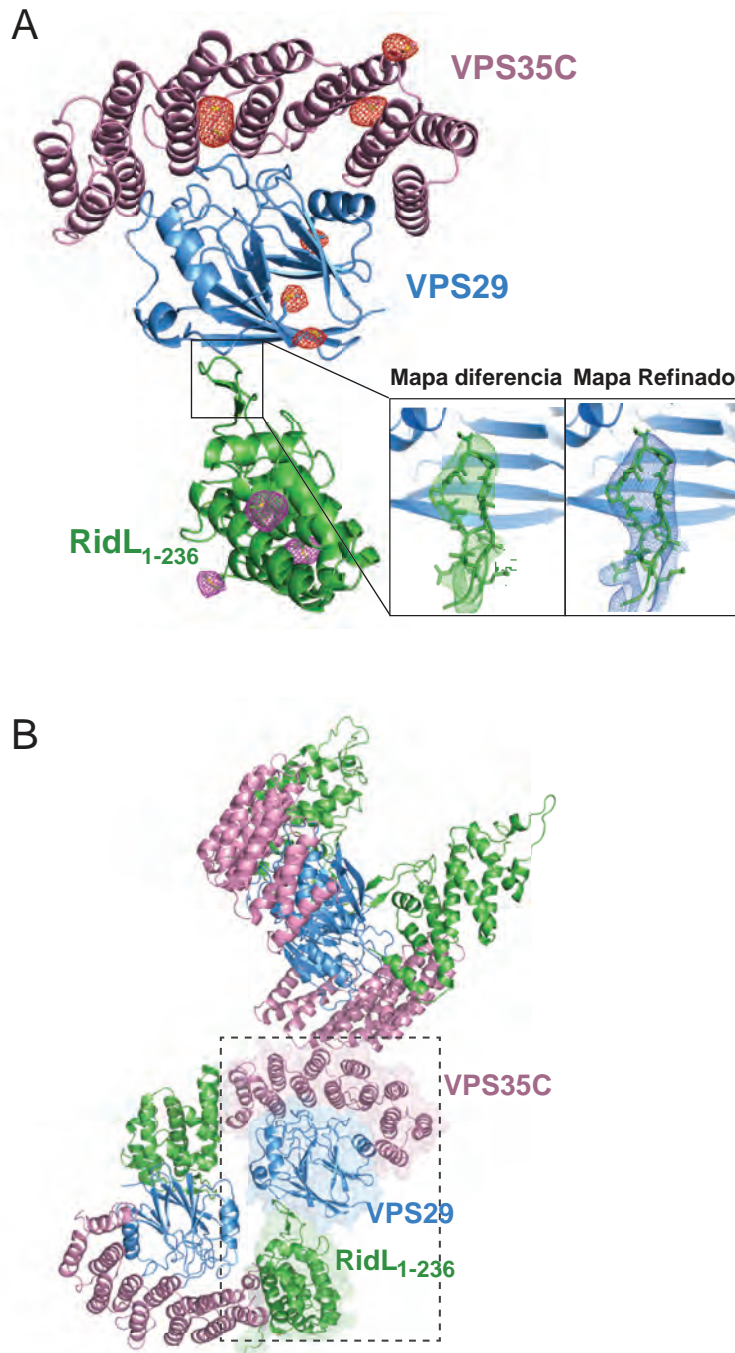


Figura 17. Estructura del complejo formado por RidL₁₋₂₃₆ y VPS29-VPS35C. (A) Vista general de la estructura del complejo de RidL₁₋₂₃₆ con VPS29-VPS35C y mapa anómalo calculado mediante derivatización con selenometionina. Los cuadros situados en la parte inferior derecha muestran el mapa de diferencia (F_0-F_c), en el cual se ha eliminado el “hairpin loop”, y el mapa final del refinamiento ($2F_0-F_c$) correspondiente a esta región. (B) Representación de la unidad asimétrica que forma la red cristalina. La unidad biológica, formada por el heterotrímero, se indica en el interior del rectángulo en línea discontinua. Las diferentes subunidades aparecen coloreadas como se detalla: VPS29 (azul), VPS35C (rosa) y RidL₁₋₂₃₆ (verde).

El cristal del heterotrímero formado por RidL₁₋₂₃₆, VPS29 y VPS35C contuvo cuatro copias del complejo en la unidad asimétrica (fig. 17B). Cada molécula de RidL₁₋₂₃₆ se une mediante contactos cristalográficos a dos lugares diferentes de VPS35C para permitir el empaquetamiento en el cristal. Además, cada molécula de RidL₁₋₂₃₆ interactu a con una única copia de VPS29 a través de un “hairpin loop” (lazo en forma de horquilla), localizado entre los aminoácidos 163 y 176 (fig. 17A). Este sitio de unión es la única región de RidL₁₋₂₃₆ que establece contactos con VPS29, poniendo de manifiesto que el peso de la interacción recae en este “hairpin loop”. La zona de VPS29 donde tiene lugar la unión se encuentra situada en el extremo opuesto al de interacción con VPS35C.

4.1.5. Estructura del “hairpin loop” de RidL en complejo con VPS29-VPS35C

Debido a la baja resolución obtenida en el complejo formado por RidL₁₋₂₃₆ y VPS29-VPS35C, no se pudieron modelar con total seguridad los residuos del “hairpin loop” que participan en la interacción. Sin embargo, este modelo s  permitió determinar claramente la región de RidL a través de la cual se produce el reconocimiento de VPS29, definida entre los residuos 163 y 176. Basándonos en estas observaciones, se decidió caracterizar en mayor detalle el sitio de unión entre ambas proteínas. Para ello, se cristalizó el péptido que comprende todo el “hairpin loop” (RidL_{loop}, residuos ₁₆₃KEEYTPPTIPPKAIN₁₇₆) con el subcomplejo VPS29-VPS35C y se resolvió su estructura a 2.5   de resolución (fig. 18A y tabla 8). El mapa de diferencia obtenido mediante el método de reemplazamiento molecular, utilizando como modelo de búsqueda la estructura del subcomplejo formado por VPS29-VPS35C, mostró una clara densidad electrónica correspondiente al “hairpin loop”. Esta solución permitió definir las cadenas laterales de los diferentes aminoácidos del péptido, identificando los residuos de RidL_{loop} implicados en la interacción con el retrómero (fig. 18B-C). El sitio de unión en VPS29, formado por residuos hidrofóbicos, también fue claramente definido (fig. 19B).

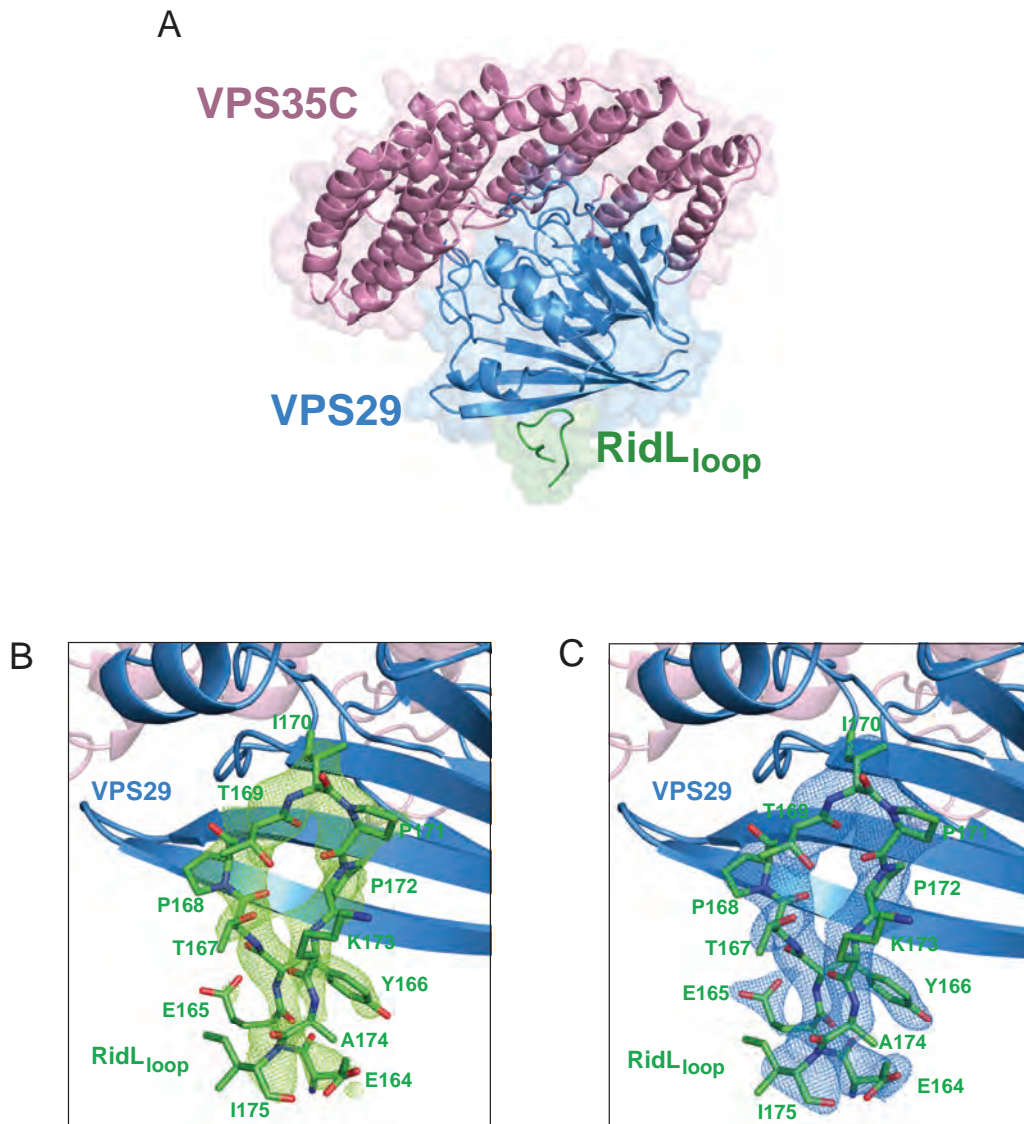


Figura 18. Estructura de VPS29-VPS35C en complejo con el “hairpin loop” de RidL. (A) Vista general del complejo formado por RidL_{loop} (verde), VPS29 (azul) y VPS35C (rosa), representado mediante diagramas de Richardson. (B) Mapa de diferencia (F_0-F_c) correspondiente al RidL_{loop}. Las cadenas laterales de los residuos que participan en la interacción con VPS29 se muestran en modo “stick”. El nombre de los aminoácidos que forman el RidL_{loop} se indican en color verde. (C) Densidad electrónica refinada del “hairpin loop” de RidL ($2F_0-F_c$). Los diferentes residuos se muestran como en B.

El reconocimiento de la superficie hidrofóbica de VPS29 por parte del “hairpin loop” de RidL ocurre principalmente a través de interacciones hidrofóbicas, cubriendo un área de aproximadamente 420 \AA^2 (fig. 19A-B). Las cadenas laterales de la prolina 168 (P168), la isoleucina 170 (I170) y la prolina 171

(P171), situadas en el borde del “hairpin loop” de RidL, son los residuos más importantes en la formación del complejo al ocupar el centro de la interfase entre ambas proteínas (fig. 19A). La prolina 168 interacciona con una superficie hidrofóbica en VPS29 formada por los aminoácidos leucina 25 (L25), valina 172 (V172) y valina 174 (V174). El grupo carbonilo de la treonina 169 (T169), localizado en la cadena principal de RidL_{loop}, establece un puente de hidrógeno con la tirosina 165 (Y165) de VPS29. La cadena lateral de I170 se inserta profundamente en el interior de la cavidad formada por la leucina 2 (L2), la leucina 25 (L25), la leucina 26 (L26), la lisina 30 (K30), la isoleucina 31 (I31), la leucina 152 (L152) y la tirosina 165 (Y165) de VPS29. El residuo posterior en el “hairpin loop” de RidL, ocupado por la prolina 171 (P171), contribuye aún más al enterramiento de I170 mediante el establecimiento de contactos hidrofóbicos con L2 y L152 de VPS29. De manera adicional, este residuo permite posicionar P172 a través de la unión con el residuo Y163 de VPS29, creando contactos entre los anillos de sus cadenas laterales. La interacción entre RidL_{loop} y VPS29 es reforzada por puentes de hidrógeno entre la tirosina 166 (Y166) de RidL y la arginina 176 (R176) de VPS29. De forma más periférica, Y166 se encuentra situada en el interior del cruce entre el “hairpin loop” y el bolsillo hidrofóbico expuesto formado por Y163, V174 y R176 de VPS29, proporcionando de esta manera una extensión de la superficie de contacto entre ambas proteínas que permite estabilizar la conformación del “hairpin loop”. Los estudios filogenéticos realizados (fig. 19D) mediante la comparación de la secuencia primaria de VPS29 humana, que representa el hospedador en el que se desarrolla la enfermedad, y sus homólogos de metazoos entre los que se incluye el género amoebae, su huésped natural, mostraron que todos los residuos de VPS29 localizados en el sitio de unión a RidL están altamente conservados (fig. 19C), poniendo de manifiesto que la interacción entre ambas proteínas se establece de forma similar en todos los hospedadores de *Legionella pneumophila*.

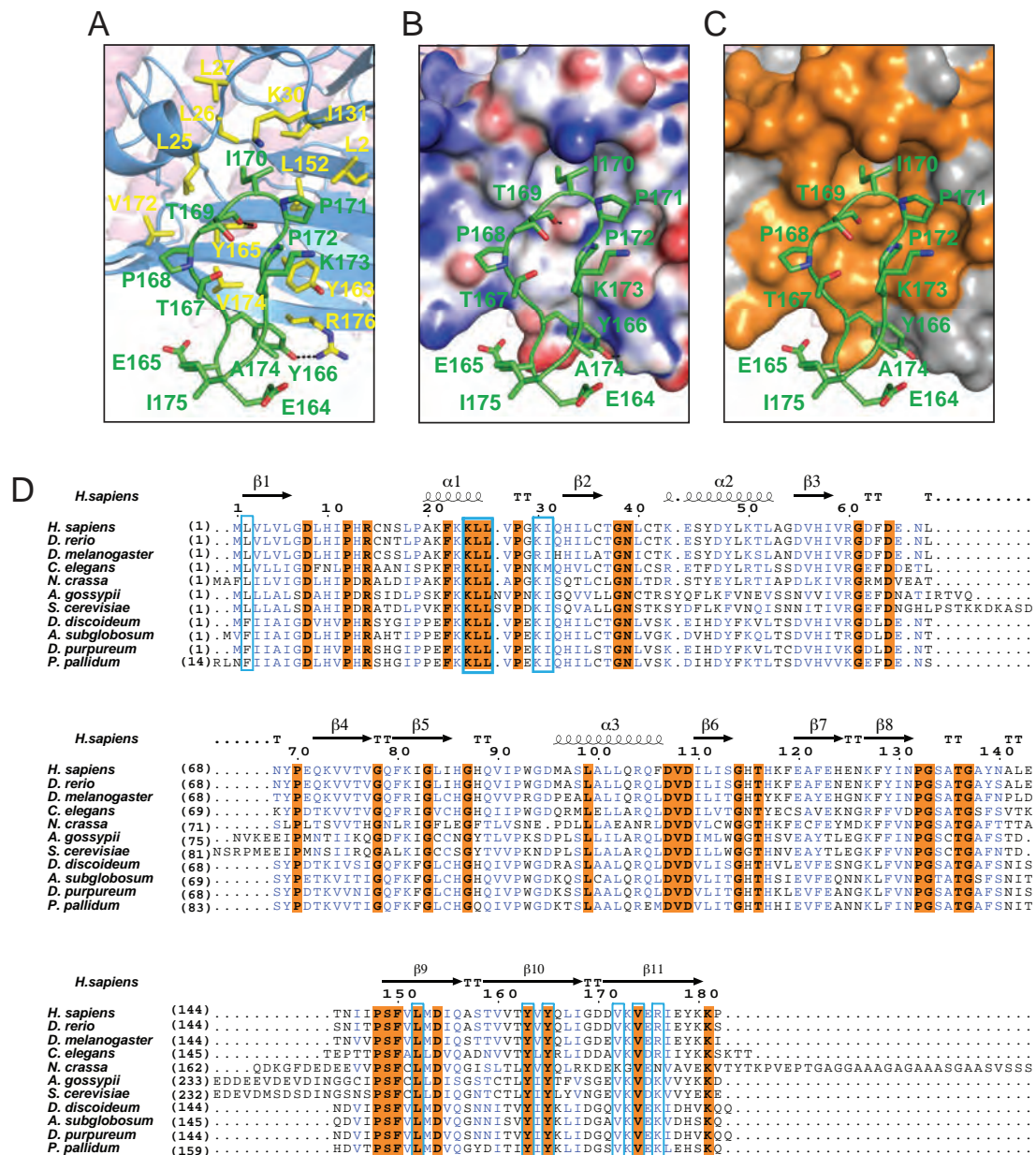


Figura 19. Representación detallada de la interacción de RidL_{100p} con VPS29. (A) Residuos presentes en la superficie de contacto de VPS29 (amarillo) y RidL_{100p} (verde) representados en modo “stick”. Los puentes de hidrógeno formados se muestran mediante líneas discontinuas. (B) Representación del potencial electrostático (-25 a 25 kT/e, de rojo a azul) de la superficie de VPS29 implicada en el reconocimiento del “hairpin loop” en la misma orientación que en A. (C) Representación en la superficie de VPS29 los residuos estrictamente conservados (naranja) en D. (D) Alineamiento de secuencia de VPS29 humana con sus homólogos de metazoos. Los residuos estrictamente conservados aparecen coloreados en naranja y los equivalentes en azul. Los aminoácidos implicados en la interacción con RidL se encuadran en un rectángulo azul. Los elementos de estructura secundaria correspondientes a la forma humana (código PDB: 1W24) se muestran en la parte superior del alineamiento. Los códigos de acceso de las secuencias alineadas son: Homo sapiens (Q9UBQ0), Danio rerio (NP_956331), Drosophila melanogaster

(NP_608575), *Caenorhabditis elegans* (CAA87426), *Neurospora crassa* (XP_328261), *Ashbya gossypii* (NP_985958), *Saccharomyces cerevisiae* (P38759), *Acytostelium subglobosum* (XP_012752570), *Polysphondylium pallidum* (XP_020436230), *Dictyostelium discoideum* (XP_636520), y *Dictyostelium purpureum* (XP_003285937).

4.1.6. Las mutaciones en la interfase entre RidL y VPS29 impiden la formación del complejo

Para confirmar que el modelo de unión propuesto, a partir de las estructuras cristalográficas obtenidas entre RidL y retrómero, es el responsable de la formación del complejo en solución, se generaron diferentes mutantes puntuales de ambas proteínas en los residuos localizados en el sitio de unión y se analizó el efecto de cada uno de ellos mediante ensayos “pull-down” y calorimetría de titulación. Las mutaciones individuales introducidas en la región central de VPS29 fueron L152E, Y163A y Y165A. En RidL, por un lado, se reemplazó la región central del “hairpin loop” (aminoácidos 166-173), por una única glicina (RidL Δ L) y por otro lado, se crearon dos mutantes puntuales Y166A e I170A. La sustitución de cualquiera de los residuos anteriormente mencionados impidió la formación del complejo entre GST-RidL y VPS29 en los ensayos “pull-down” (fig. 20A). Además, este mismo resultado fue observado en las medidas calorimétricas, ya que las mutaciones produjeron la pérdida completa de unión (fig. 20B). Para comprobar que las sustituciones realizadas no introdujeron cambios significativos en la estructura secundaria, se comparó el espectro obtenido mediante dicroísmo circular de cada una de las proteínas mutadas con las proteínas nativas (fig 20C-D). La estructura general de los mutantes de RidL y VPS29 se mantuvo sin cambios, permitiendo descartar su mal plegamiento como causa de la ausencia de unión. Todos estos resultados pusieron de manifiesto que los contactos hidrofóbicos y los puentes de hidrógeno establecidos entre VPS29 y RidL en la estructura cristalográfica son de suma importancia para la formación del complejo en solución.

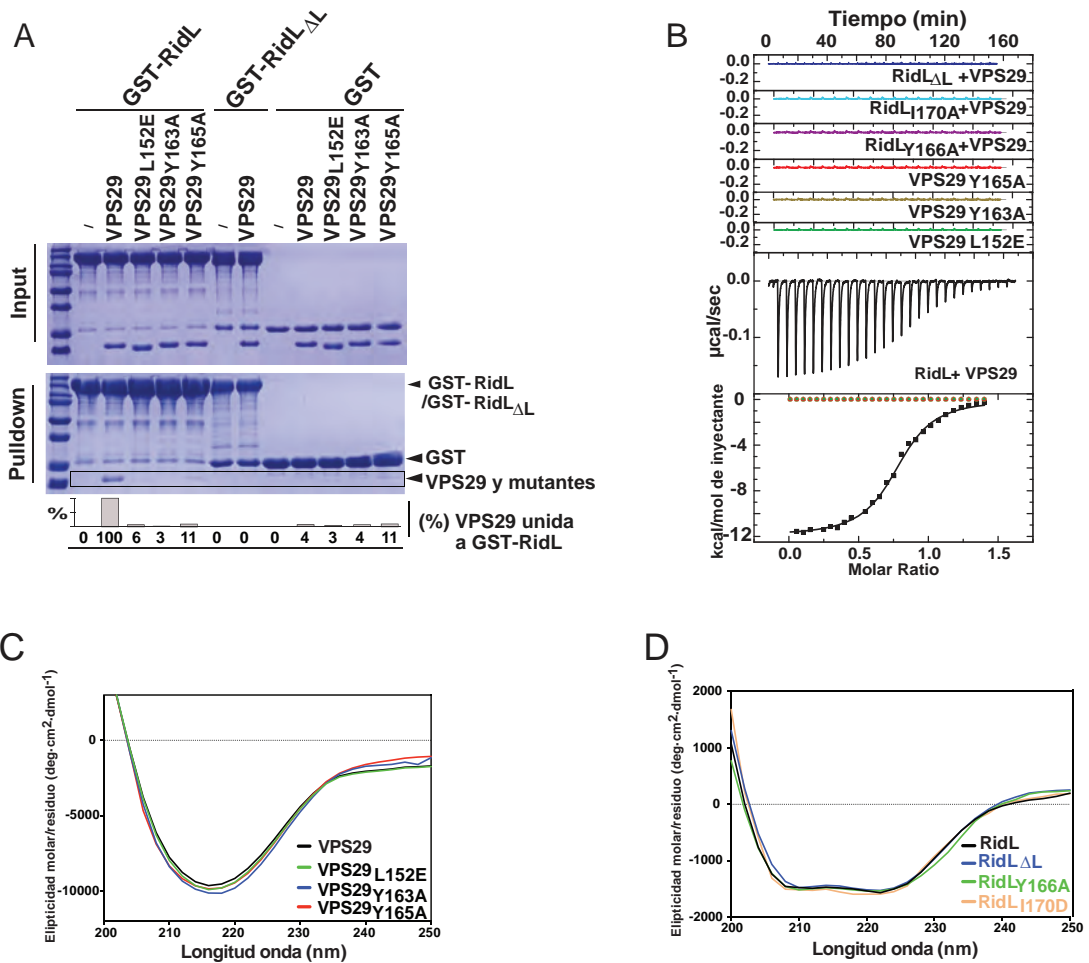


Figura 20. Residuos clave en la formación del complejo RidL-VPS29. (A) Gel SDS/PAGE del ensayo “pull-down” entre VPS29 y sus diferentes mutantes con GST-RidL, GST-RidL Δ L o GST (control). Los controles con la etiqueta de GST mostraron una mínima unión inespecífica. El gráfico situado en la parte inferior corresponde a la cuantificación mediante densitometría de la cantidad de VPS29 unida en los diferentes experimentos. (B) Isotherma de la calorimetría de titulación de RidL, RidL Δ L o sus diferentes mutantes puntuales (Y166A, I170D) frente a las diferentes formas de VPS29. (C) Espectros obtenidos a partir de VPS29 (morado), VPS29_{L152E} (verde), VPS29_{Y163A} (azul) y VPS29_{Y165A} (rojo) mediante dicroísmo circular. La elipticidad, expresada a través de la elipticidad molar por residuo, se representa frente a la longitud de onda en nm. (D) Espectros obtenidos a partir de RidL (negro), RidL Δ L (azul), y los mutantes puntuales RidL_{Y166A} (verde) y RidL_{I170D} (naranja) mediante dicroísmo circular.

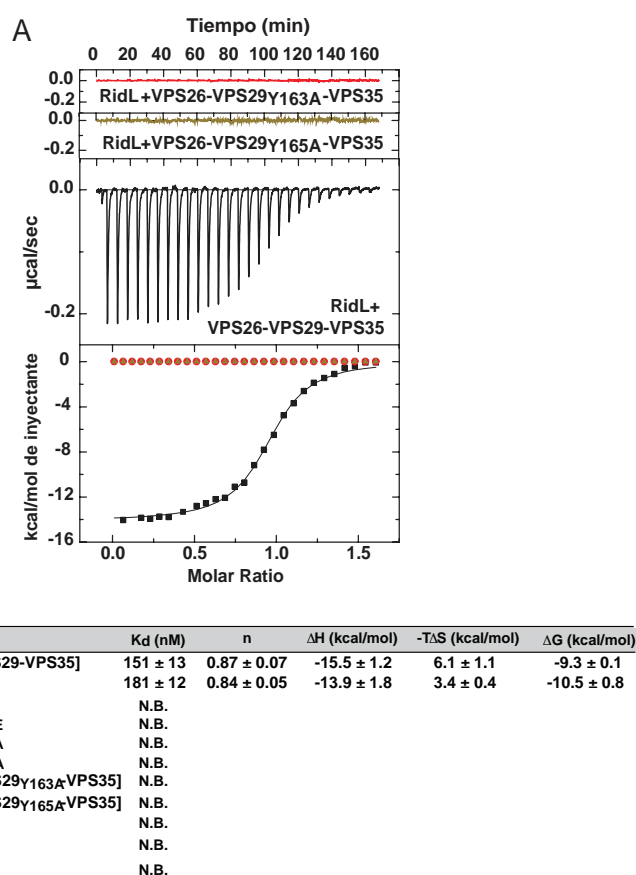


Figura 21. (A) Isotherma de la titulación de RidL frente a retrómero (negro), retrómero con el mutante puntual de VPS29_{Y163A} (rojo) y retrómero con VPS29_{Y165A} (marrón). (B) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas con las diferentes formas de RidL y VPS29. La ausencia de interacción se expresa con las siglas N.B. (“No binding”).

Finalmente, se analizó la interacción entre el péptido sintético RidL_{loop} con VPS29 en solución. A pesar de que este péptido pudo ser cristalizado junto a VPS29 y VPS35C, los experimentos de ITC realizados no permitieron cuantificar su interacción con el retrómero (fig. 21B). Este resultado pudo deberse a que el péptido requiere la forma de horquilla para su interacción con VPS29, la cual en solución no se establece en ausencia de los residuos adyacentes al “hairpin loop”. Probablemente, los experimentos cristalográficos favorecieron la unión del péptido al llegar a un equilibrio de mínima energía conformacional en su interacción con VPS29. Es por ello que se analizó la afinidad de RidL frente a los mutantes puntuales del retrómero, VPS26-VPS29_{Y165A}-VPS35 y VPS26-VPS29_{Y163A}-VPS35, para comprobar que los contactos observados en la estructura de RidL₁₋₂₃₆ y VPS29-VPS35C están implicados en la interacción al retrómero (fig. 21A). A diferencia de la forma nativa del retrómero, la presencia

de los mutantes puntuales, VPS29_{Y165A} y VPS29_{Y163A}, inhibió completamente la unión de RidL, confirmando que el “hairpin loop” de RidL, a través de su conformación de horquilla, y la superficie hidrofóbica de VPS29 son las únicas regiones implicadas en la interacción.

4.1.7. Ensamblaje del complejo RidL-retrómero en solución

La unidad biológica obtenida a partir de la estructura de RidL₁₋₂₃₆ y VPS29-VPS35C muestra dos macromoléculas conectadas entre sí a través de un único punto de interacción situado en el “hairpin loop” de RidL. En este sentido, se decidió estudiar la forma global del complejo en solución para determinar si la región perteneciente al “hairpin loop” posee cierta flexibilidad. Mediante dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) se obtuvieron modelos representativos a partir de las muestras formadas por RidL₁₋₈₆₆-VPS29-VPS35C y RidL₁₋₄₂₀-retrómero. La estructura del complejo formado por RidL₁₋₈₆₆ y VPS29-VPS35C mostró una forma alargada con una ligera torsión que delimita dos bordes que sobresalen (fig. 22A). En cambio, el modelo de RidL₁₋₄₂₀-retrómero reveló una estructura en forma de codo (fig. 22B). El refinamiento a cuerpo rígido de las estructuras cristalográficas de RidL₁₋₈₆₆, VPS29-VPS35C, RidL₁₋₄₂₀ y el retrómero sobre los modelos de SAXS, resultó en un ajuste significativo ($\chi^2 = 1.2$ y $\chi^2 = 2.5$, respectivamente) entre la dispersión teórica de los perfiles de cada macromolécula y los datos experimentales, permitiendo su validación (fig. 22C-D). La superposición de ambos modelos proporcionó la forma global del complejo RidL₁₋₈₆₆-retrómero en solución, revelando una arquitectura distintiva en forma de V (fig. 22E). Este modelo no se pudo obtener a partir del complejo RidL-retrómero directamente debido a la existencia de un equilibrio multiconformacional en esta muestra que impidió el ajuste en una única conformación. La orientación del “hairpin loop” en ambos modelos se mantuvo esencialmente inalterada descartando la flexibilidad de esta región. Este resultado está en concordancia con la estructura de RidL₁₋₈₆₆ (fig. 16) y la del complejo RidL₁₋₂₃₆-VPS29-VPS35C (fig. 17), donde a pesar de las diferentes condiciones de cristalización utilizadas y los contactos cristalográficos

establecidos para el empaquetamiento de los cristales, la orientación de esta región también se mantiene sin cambios.

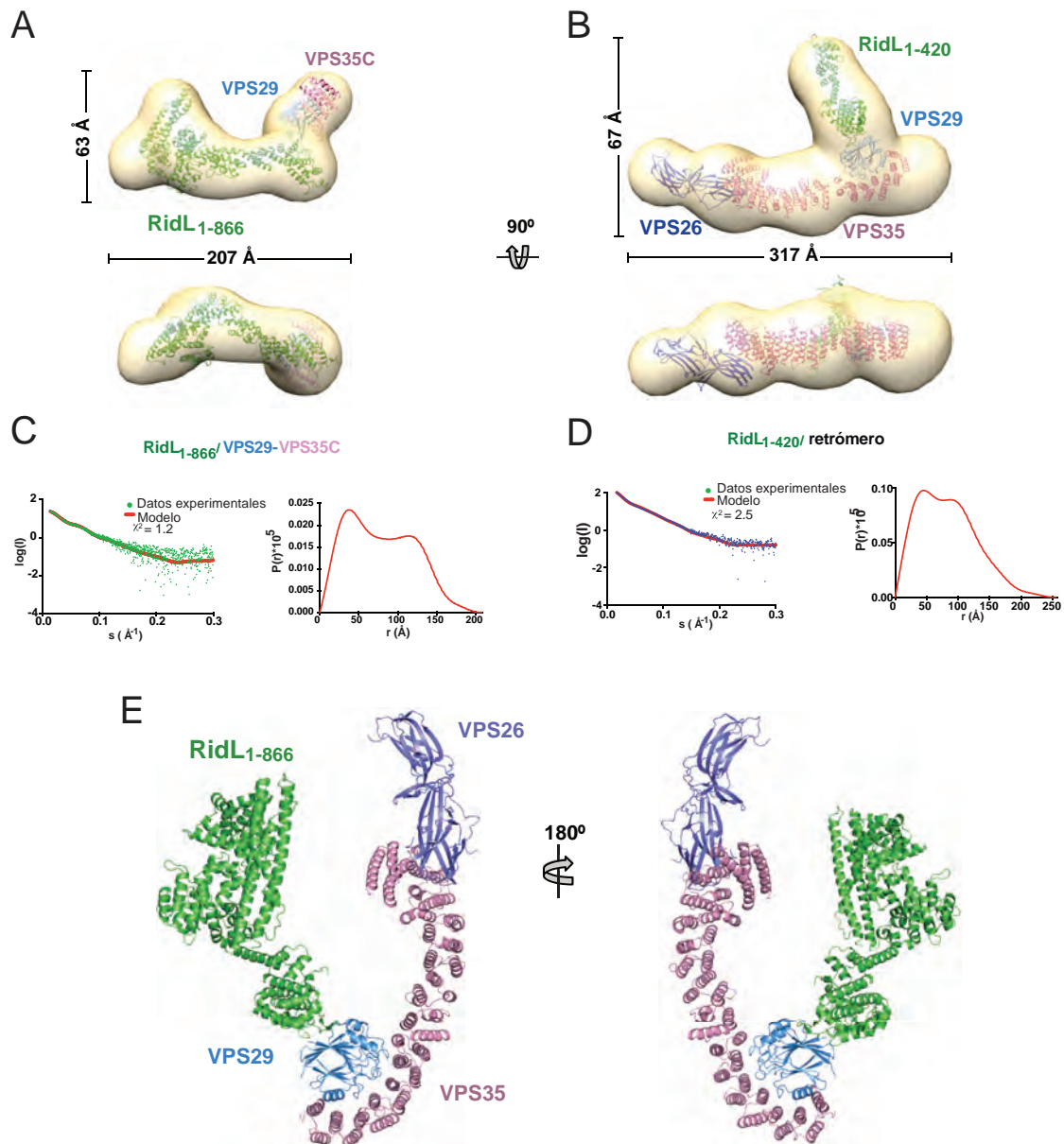


Figura 22. Conformación general del complejo RidL-retrómero en solución. Modelos tridimensionales a baja resolución generados a partir de los datos de SAXS de los complejos formados por (A) RidL₁₋₈₆₆ y VPS29-VPS35C y (B) RidL₁₋₄₂₀ y retrómero. El nombre de cada una de las subunidades aparece reflejado. Curvas de dispersión de los complejos (C) RidL₁₋₈₆₆-VPS29-VPS35C y (D) RidL₁₋₄₂₀-retrómero. Los datos de SAXS se representan como el logaritmo de la intensidad de dispersión (I) frente a la transferencia del momento (s). Los datos experimentales se muestran en verde o azul mientras que la dispersión calculada del mejor modelo corresponde a la línea roja. El gráfico de la función de distancias P(r) se muestra para ambos modelos. (E) Modelo propuesto para el complejo RidL₁₋₈₆₆-retrómero, obtenido de la superposición de los modelos presentados en A y B a través de su zona común en RidL₁₋₄₂₀.

4.1.8. RidL permite la formación de dímeros de retrómero

Estudios previos a la realización de este trabajo demostraron que el retrómero puede formar dímeros a través de la región C-terminal de VPS35 y VPS29 en condiciones de alta concentración de proteína y fuerza iónica fisiológica (56). Aunque todavía no se conocen los detalles moleculares y funcionales de este proceso, la propensión que presenta el retrómero a la dimerización ha sido propuesta como uno de los mecanismos clave en el revestimiento de sus vesículas. Por tanto, debido a que RidL se une al retrómero a través de VPS29 se decidió analizar si la unión de RidL afecta a la dimerización del retrómero. Para ello, se utilizó la técnica de cromatografía de exclusión de tamaño con dispersión de luz multiangular (SEC-MALS). Usando esta metodología se calculó la masa molecular de cada complejo a dos diferentes concentraciones de sal (150 mM y 300 mM). En este experimento se observó que RidL se comportó como un monómero bajo ambas condiciones iónicas (fig. 23A). Del mismo modo, cuando RidL se incubó con la forma monomérica del retrómero (300 mM NaCl) la masa molecular calculada fue consistente con la de un complejo formado por una sola copia de ambas proteínas. Sin embargo, al encontrarse formando complejo con el retrómero en condiciones fisiológicas (150 mM NaCl), la masa molecular obtenida estuvo en concordancia con la de un oligómero 2:2 (fig. 23B), poniendo de manifiesto que la interacción de RidL con el retrómero no impide su dimerización en solución.

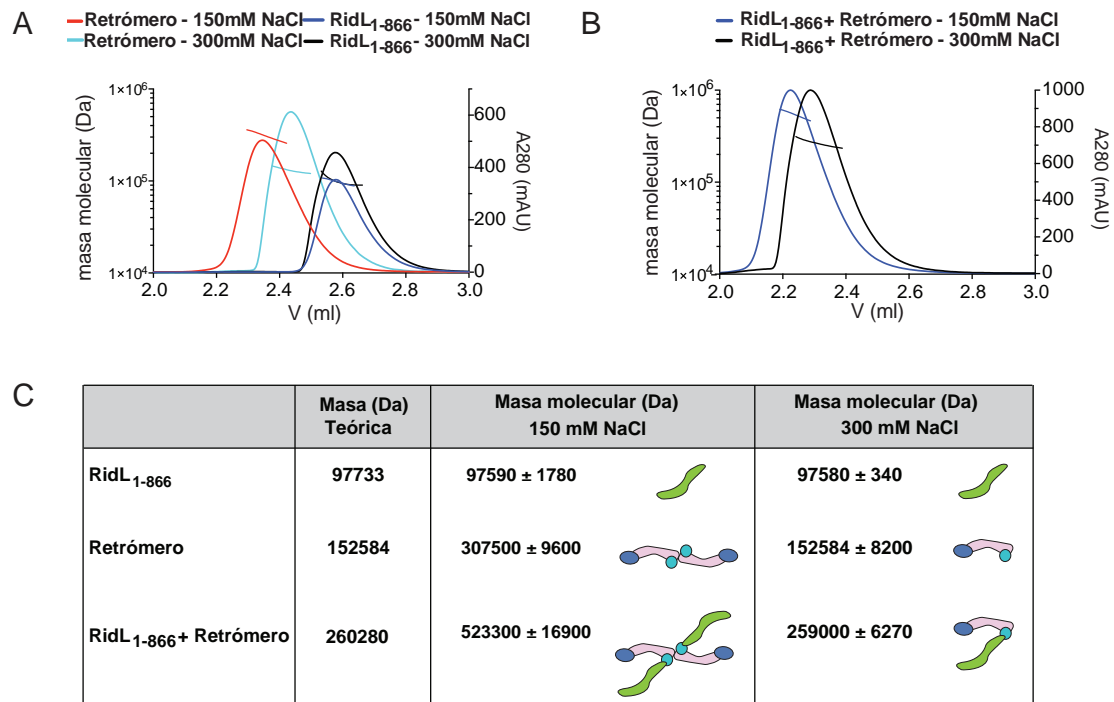


Figura 23. Caracterización de la interacción entre RidL y retrórero mediante SEC-MALS. (A) Análisis de RidL₁₋₈₆₆ y retrórero mediante SEC-MALS en dos condiciones iónicas diferentes, 150mM NaCl y 300mM NaCl. La masa molecular (Da) aparece representada frente al volumen de elución obtenido en una columna Shodex KW403-4F. Las curvas de color rojo y cian corresponden a medidas del retrórero en 150mM NaCl y 300mM NaCl respectivamente. Las curvas de color negro y azul corresponden a RidL₁₋₈₆₆ en las dos concentraciones de sal analizadas. (B) Análisis del complejo formado por RidL₁₋₈₆₆ y retrórero mediante SEC-MALS en dos condiciones iónicas diferentes, 150mM NaCl y 300mM NaCl. Las curvas de color azul y negro corresponden al dímero y el monómero de este complejo respectivamente. (C) Comparación de la masa teórica obtenida a partir de la secuencia primaria de las proteínas y la masa molecular calculada a partir de las medidas del MALS, en las diferentes condiciones iónicas utilizadas en el experimento. En cada experimento se indica con un dibujo esquemático las subunidades presentes en la muestra.

4.1.9. RidL se localiza en la membrana de los endosomas a través de la interacción con la subunidad VPS29 del retrórero

Para analizar si la interacción propuesta entre RidL y retrórero es también relevante *in vivo*, se observó la distribución de RidL en el interior de la célula. Mediante microscopía de fluorescencia se analizó la localización de las proteínas de fusión formadas por el constructo RidL₁₋₂₃₆ y la proteína fluorescente verde (GFP-RidL₁₋₂₃₆) o el fluoróforo m-Cherry (mCherry- RidL₁₋₂₃₆) en células HeLa vivas. El fragmento terminal de RidL se sobreexpresó en altos niveles

permitiendo su identificación (fig. 24A). Estudios adicionales revelaron que RidL₁₋₂₃₆ colocalizó simultáneamente con las subunidades del retrómero VPS26 (fig. 24B-C) y VPS29, así como con el marcador de endosomas EEA1 (fig. 24D-E). Sin embargo, la eliminación de la región correspondiente al “hairpin loop” (GFP- o mCherry-RidL_{1-236,ΔL}) evitó su interacción con el retrómero dando lugar a una distribución difusa de RidL en el citosol celular. Para determinar la localización de RidL, se sobreexpresó GFP- o mCherry-RidL₁₋₂₃₆ junto a diferentes marcadores de orgánulos como las proteínas de endosomas tempranos Rab5 y SNX12 y la proteína perteneciente a la red *trans*-Golgi TGN38. En estos experimentos, RidL₁₋₂₃₆ colocalizó con Rab5 y SNX12 y no con TGN38, permitiendo determinar la presencia de RidL en los endosomas tempranos (fig. 25). Además, la magnificación de estas imágenes permitió identificar a RidL₁₋₂₃₆ junto a VPS29 en las vacuolas endosomales y los túbulos que emanan de estos orgánulos. Estos estudios demostraron que RidL se localiza específicamente en los endosomas a través de la unión con el retrómero y que la región del “hairpin loop” es clave en esta interacción. No obstante, la presencia de RidL en estos orgánulos no afectó a la localización del retrómero.

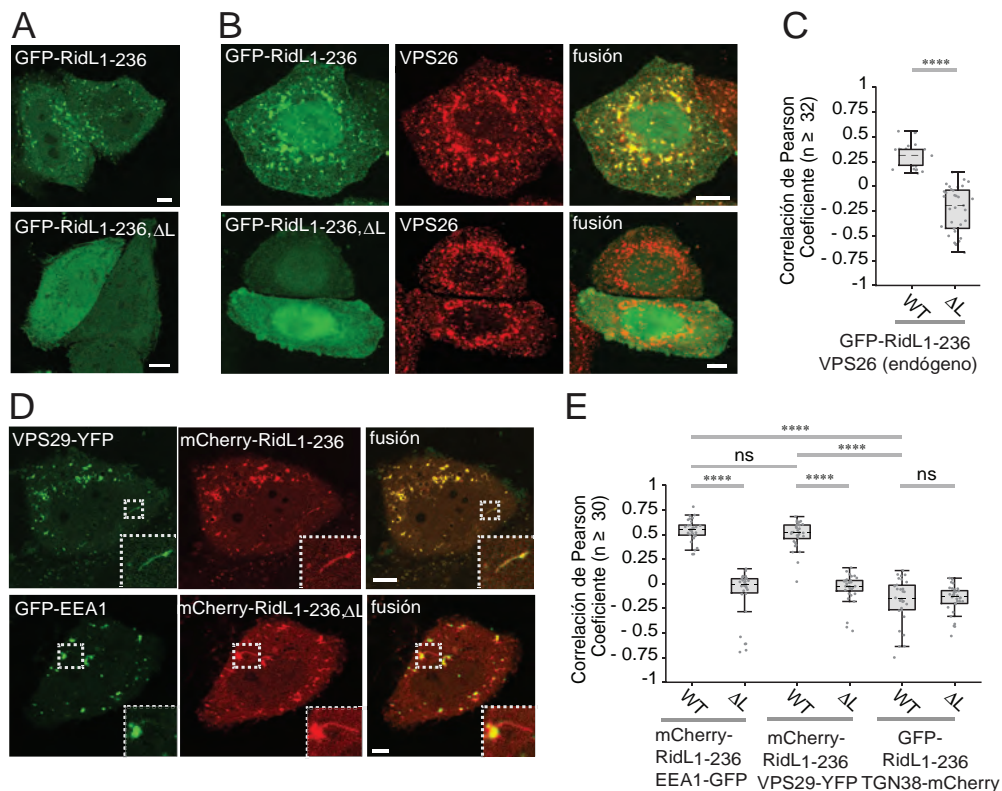


Figura 24. RidL se localiza en los endosomas ocupados por el retrómero. (A) Imagen de células Hela 24 horas después de ser transfectadas con GFP-RidL₁₋₂₃₆ o GFP-RidL_{1-236, ΔL}. (B) Microscopía de fluorescencia de células Hela transfectadas con plásmidos que codifican GFP-RidL₁₋₂₃₆ o GFP-RidL_{1-236, ΔL} y fijadas 24 horas antes de ser incubadas con anticuerpos específicos para la subunidad VPS26 del retrómero. La colocalización entre GFP-RidL₁₋₂₃₆ y VPS26 se da en los endosomas. (C) Cuantificación de la colocalización entre GFP-RidL₁₋₂₃₆ y VPS26. El valor representa la media de al menos 32 células en tres experimentos independientes. (D) Microscopía de fluorescencia de células Hela cotransfectadas con plásmidos codificando YFP-VPS29 o el marcador de endosomas EEA1-GFP y mCherry-RidL₁₋₂₃₆. Los cuadrados representan la magnificación de los túbulos que emanan de los endosomas. (E) Cuantificación de la colocalización entre GFP-RidL_{1-236, ΔL}, GFP-RidL₁₋₂₃₆ y VPS29. El valor representa la media de al menos 32 células en tres experimentos independientes.

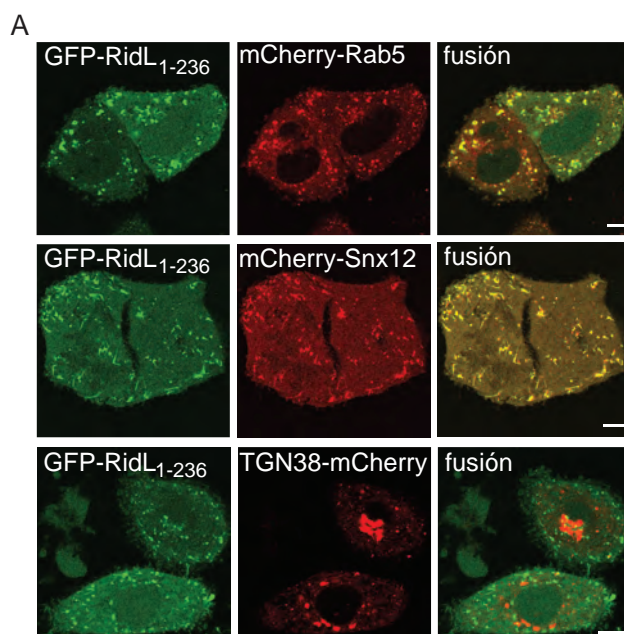


Figura 25. RidL colocaliza con la Rab5 y la SNX12 en la membrana de los endosomas. (A) Microscopía de fluorescencia de GFP-RidL₁₋₂₃₆ en relación a diferentes marcadores de orgánulos. Las células Hela fueron cotransfectadas con plásmidos que codifican GFP-RidL₁₋₂₃₆ y Rab5-mCherry, mCherry-SNX12 o mCherry-TGN38.

4.1.10. RidL compete con proteínas accesorias del retrómero por el mismo sitio de unión a VPS29

La subunidad VPS29 del retrómero posee dos superficies localizadas en extremos opuestos formadas por residuos altamente conservados (64, 65). En una de estas superficies se ubica el sitio catalítico incompleto de la proteína

VPS29, el cual al interactuar con el extremo C-terminal de VPS35 queda ocluido (60). En el extremo opuesto, donde se encuentra la otra superficie conservada, interaccionan diferentes proteínas accesorias como VARP (66) y TBC1d5 (67), las cuales regulan la actividad del retrómero. La unión de RidL a VPS29 involucra el mismo conjunto de residuos hidrofóbicos implicados en la interacción con TBC1D5 y VARP, como demostraron los experimentos de ITC realizados con los mismos mutantes puntuales de VPS29 empleados en los estudios de interacción de RidL y VPS29 (fig. 27, 28). Las mutaciones L152E, Y163A y Y165A suprimieron completamente la interacción de TBC1D5 y VARP por VPS29. Además, la superposición de la estructura de VPS29 unida a la región Ins1 de TBC1D5 (código PDB: 5GTU), con la del complejo formado por VPS29-VPS35C y RidL_{loop} reveló un patrón de interacción prácticamente idéntico (fig. 26). Tanto RidL como TBC1D5 presentan o una isoleucina o una leucina en el extremo central del “loop” insertada en la superficie hidrofóbica de VPS29. Estos residuos están precedidos por una prolina dando lugar al motivo conservado P-L/I, el cual representa el eje de la interacción. La prolina permite realizar la curvatura del “loop” para posicionar correctamente la leucina/isoleucina. Sin embargo, a pesar de compartir un patrón común de interacción con VPS29, ambas proteínas muestran poca similitud de secuencia. De hecho, la dirección de la cadena principal de RidL es opuesta a la de TBC1D5 (aminoácidos I170-P171 en RidL y P141-L142 en TBC1D5).

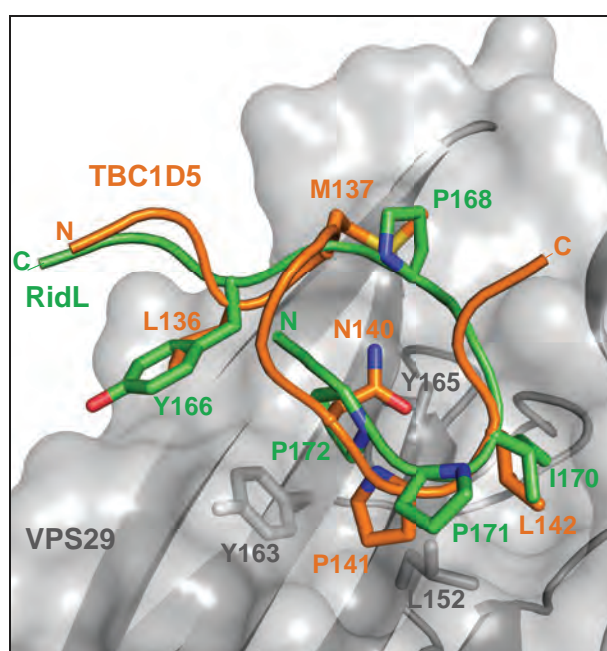


Figura 26. La unión de RidL a VPS29 involucra el mismo conjunto de residuos hidrofóbicos implicados en la interacción con TBC1D5. Superposición de la estructura de VPS29 unida a la región Ins1 de TBC1D5 (naranja) con la del complejo formado por VPS29-VPS35C y RidL_{loop} (verde). Los residuos clave en la interacción con VPS29 aparecen representados en modo “stick”.

Estudios previos a la realización de este trabajo cuantificaron la afinidad de la región de TBC1D5 implicada en la interacción con el retrómero (TBC1D5_{TBC}), así como la de los dominios ricos en cisteínas de VARP (VARPc) por VPS29 (66, 67). La K_d obtenida por estos autores fue muy similar en ambos complejos, situándose en el rango de micromolar (5-13 μ M). Adicionalmente, TBC1D5 interacciona con el retrómero a través de VPS35, incrementando su afinidad a un valor de 220 nM. Esta K_d está cerca de la obtenida en nuestras medidas de ITC entre RidL y retrómero (151 nM). Sin embargo, como pudimos comprobar tanto RidL como su fragmento N-terminal, RidL₁₋₂₃₆, presentaron una afinidad por VPS29 dos veces superior a la exhibida por TBC1D5_{TBC} y VARPc. Para comprobar la afinidad de TBC1D5_{TBC} y VARPc por VPS29 y el retrómero en las mismas condiciones en las que se realizaron las medidas con RidL, se calculó nuevamente la afinidad y los parámetros termodinámicos mediante ITC (fig. 27 y 28). Las afinidades obtenidas en nuestras medidas se situaron en el mismo rango que las calculadas anteriormente por estos autores. No obstante, el valor de K_d del TBC1D5 por el retrómero, aunque también fue comparable (450 nM vs 220 nM), fue algo mayor que el documentado previamente, mostrando mayor diferencia que el obtenido en el caso de RidL.

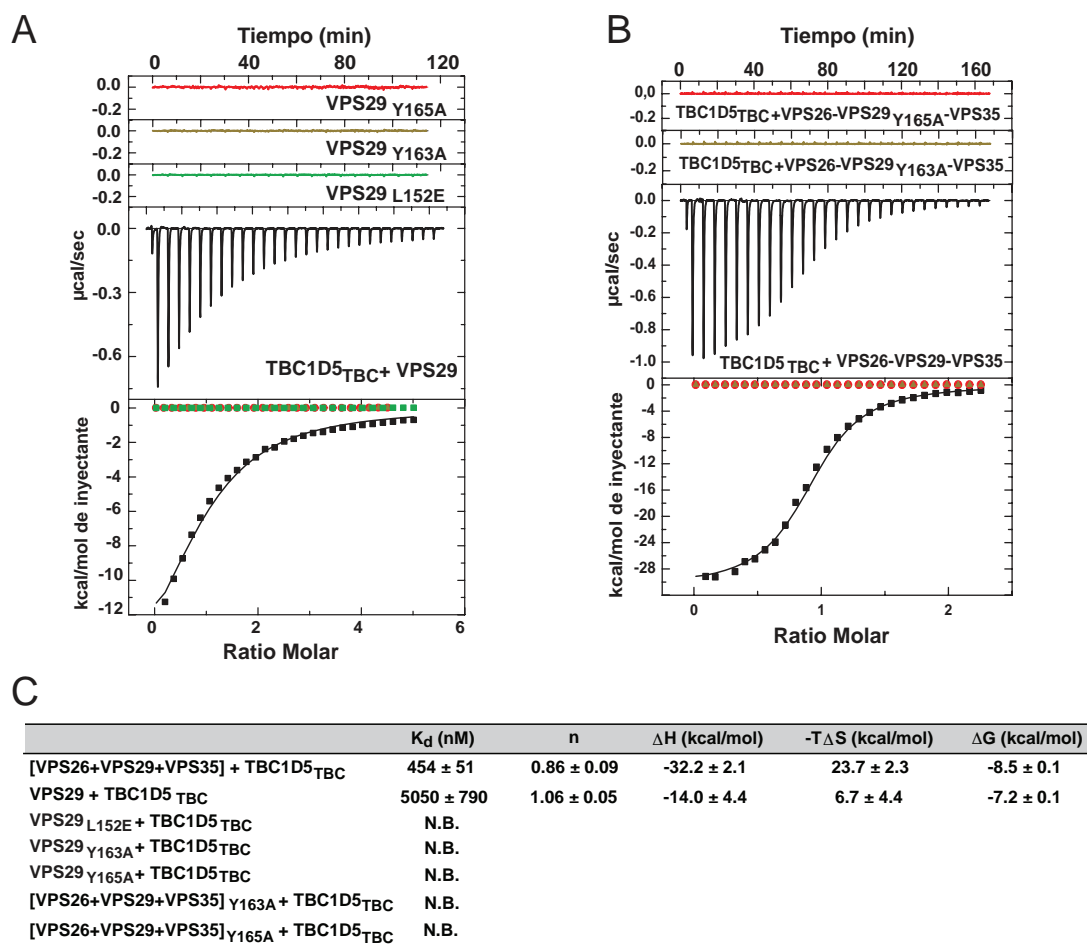


Figura 27. La unión del RidL a VPS29 involucra el mismo conjunto de residuos hidrofóbicos implicados en la interacción del TBC1D5. (A) Análisis de la interacción del TBC1D5_{TBC} con VPS29 mediante ITC. Isotherma de la titulación del TBC1D5_{TBC} frente a VPS29 (negro) y los diferentes mutantes de esta proteína Y165A (rojo), Y163A (marrón) y L152E (verde). (B) Isotherma de la titulación de TBC1D5_{TBC} frente a retrómero (negro), retrómero incluyendo el mutante puntual de VPS29_{Y165A} (rojo) y retrómero con VPS29_{Y163A} (marrón). (C) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas entre el TBC1D5_{TBC} y los diferentes mutantes de VPS29 y retrómero.

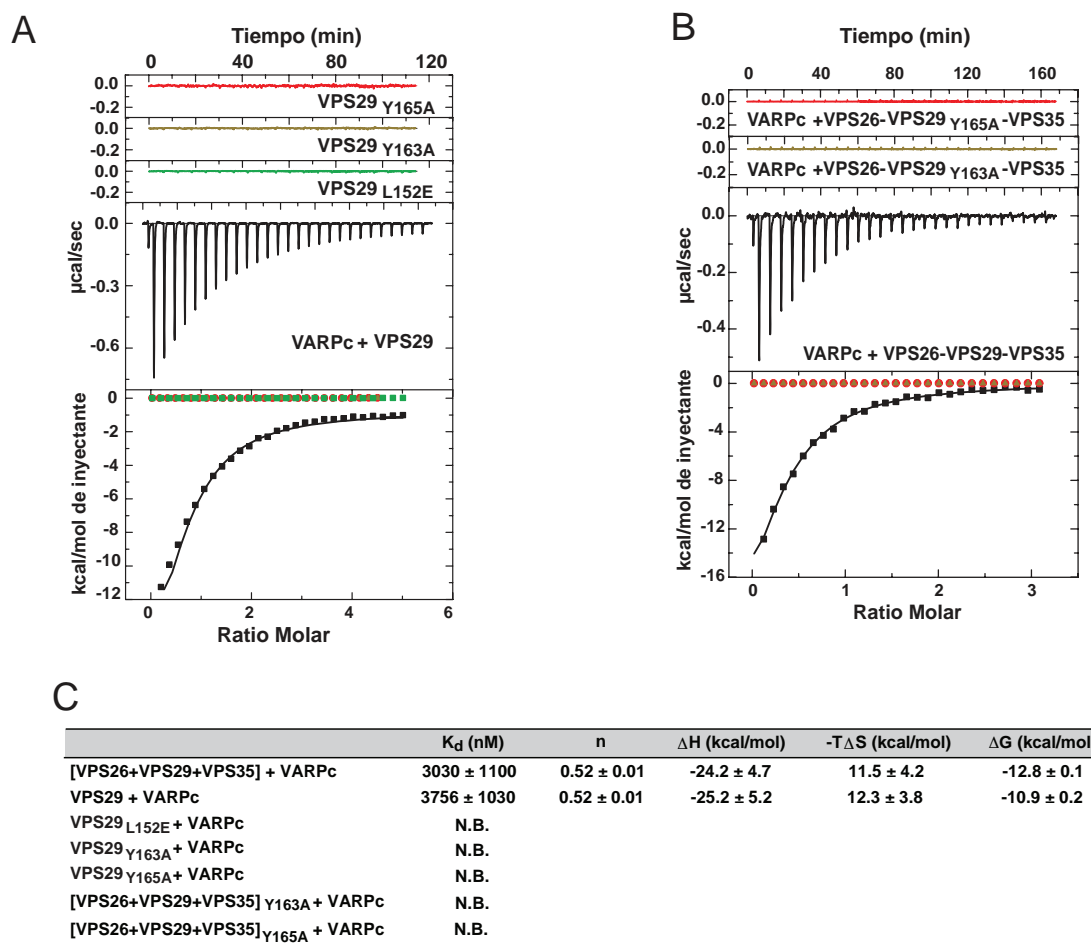


Figura 28. La unión del RidL a VPS29 involucra el mismo conjunto de residuos hidrofóbicos implicados en la interacción del VARP. (A) Análisis de la interacción de VARPc con VPS29 mediante ITC. Isotherma de la titulación del VARP frente a VPS29 (negro) y los diferentes mutantes de esta proteína Y165A (rojo), Y163A (marrón) y L152E (verde). (B) Isotherma de la titulación de TBC1D5_{TBC} frente a retrómero (negro), retrómero incluyendo el mutante puntual de VPS29_{Y165A} (rojo) y retrómero con VPS29_{Y163A} (marrón). (C) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas entre VARPc y los diferentes mutantes de VPS29 y retrómero.

La clara diferencia de afinidad por VPS29 a favor de RidL, sugirió la posibilidad de que RidL pudiese competir de manera efectiva con los ligandos endógenos TBC1D5 y VARP, por unirse al retrómero. Para estudiar esta hipótesis, se incubaron los complejos preformados TBC1D5-retrómero o VARP-retrómero, con una cantidad equimolar de RidL y se analizó posteriormente esta mezcla mediante cromatografía de exclusión de tamaño. En el caso de TBC1D5 se observó que, en ausencia de RidL, TBC1D5_{TBC} formó un complejo estable con el retrómero que eluyó en las fracciones comprendidas entre 10.5 y 12.5 ml (fig.

29A). Por el contrario, al incubar con una cantidad equimolar de RidL, TBC1D5 fue desplazado de su interacción con retrómero eluyendo en las fracciones comprendidas entre 14 y 15.5 mL, mientras que RidL coeluyó junto con el retrómero (fig. 29B-C). Este resultado mostró que bajo las condiciones ensayadas, RidL es capaz de desplazar a TBC1D5 para unirse al retrómero. Sin embargo, el mutante RidL Δ L no fue capaz de romper el complejo formado por TBC1D5 y retrómero (fig. 29B-C), indicando que la unión de RidL con VPS29 a través de su “hairpin loop” es requerida para el desplazamiento de TBC1D5. En cambio, la incubación del complejo preformado RidL-retrómero con una cantidad equimolar de TBC1D5_{TBC} no produjo la separación de RidL, mostrando que la unión de RidL con retrómero no es capaz de ser reemplazada por este ligando endógeno (fig. 29D-E).

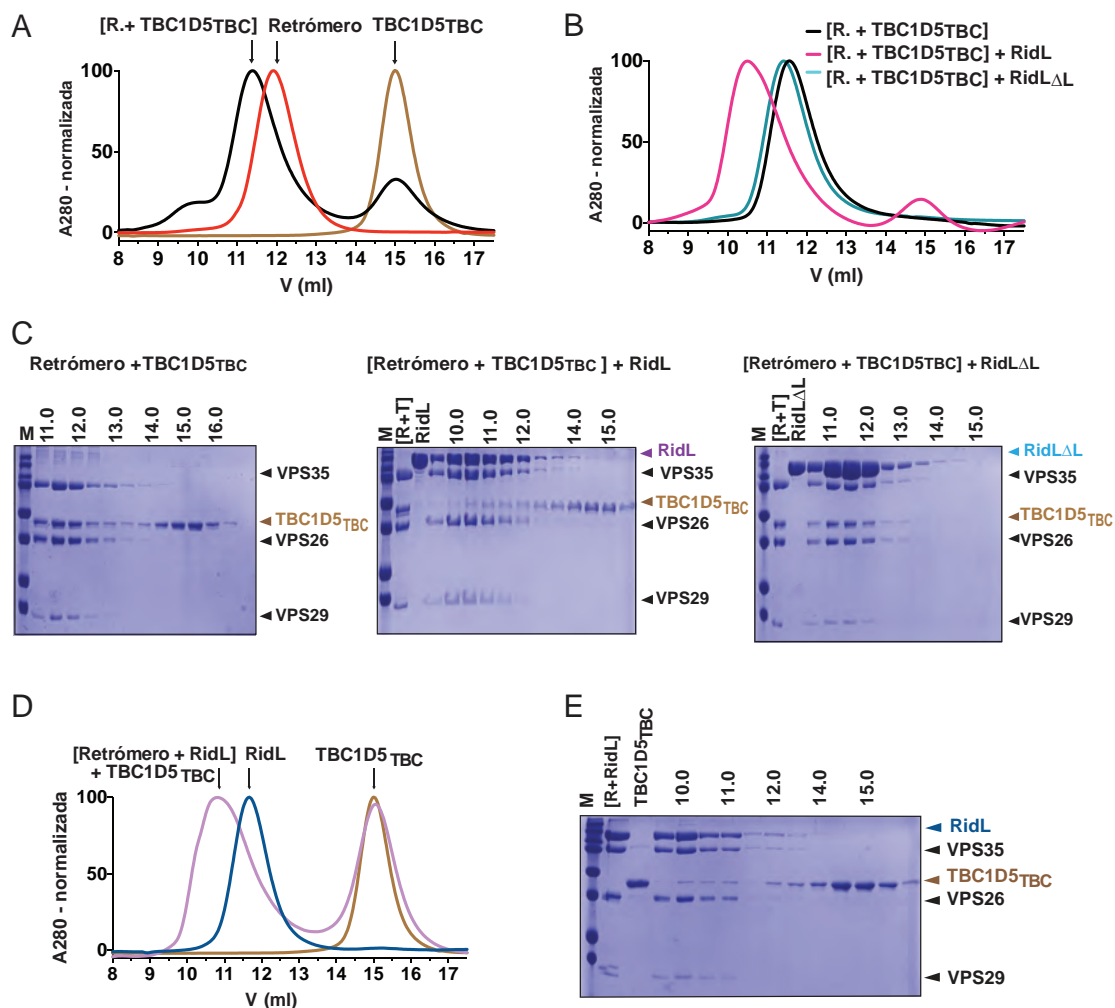


Figura 29. RidL compete con TBC1D5 por el mismo sitio de unión a VPS29. (A) Cromatograma correspondiente al complejo (negro) formado por retrómero (rojo) y TBC1D5 (marrón) a un

ratio molar 1:1.5. (B) Ensayo de competición entre RidL y TBC1D5 para unirse al retrómero. Cromatograma resultante después de mezclar el complejo retrómero-TBC1D5 (negro) con RidL (magenta) y RidL Δ L (cian) a un ratio molar 1:1. (C) Geles SDS/PAGE correspondientes a las fracciones de los diferentes cromatogramas. La posición de cada proteína aparece indicada en la parte derecha. (D) TBC1D5 no es capaz de desplazar el complejo formado por RidL y retrómero. Cromatograma resultante después de mezclar el complejo RidL-retrómero con TBC1D5 (rosa) a un ratio molar 1:1. Para su comparación se indican los cromatogramas pertenecientes a RidL (azul) y TBC1D5 (marrón). (E) Gel SDS/PAGE correspondiente a las fracciones del cromatograma del ensayo de competición. La posición de cada proteína aparece indicada en la parte derecha.

Para comprobar si la competición, observada en solución, entre RidL y TBC1D5 por unirse al retrómero se da también *in vivo*, se realizó un experimento en células Hela en las cuales se sobreexpresó GFP-TBC1D5 en combinación con mCherry-RidL $_{1-236}$ o mCherry-RidL $_{1-236, \Delta}$ L. En consonancia con los resultados obtenidos en los experimentos bioquímicos, la sobreproducción de mCherry-RidL $_{1-236}$ impidió el reclutamiento de GFP-TBC1D5 a la membrana de los endosomas al ser desplazado de su unión al retrómero (fig. 30A-B). Por el contrario, la presencia de mCherry-RidL $_{1-236, \Delta}$ L sí permitió la identificación de GFP-TBC1D5 en estos orgánulos (fig. 30A-B). Estos resultados confirmaron que RidL bloquea de forma efectiva la unión de TBC1D5 al retrómero, no sólo *in vitro* sino también *in vivo*.

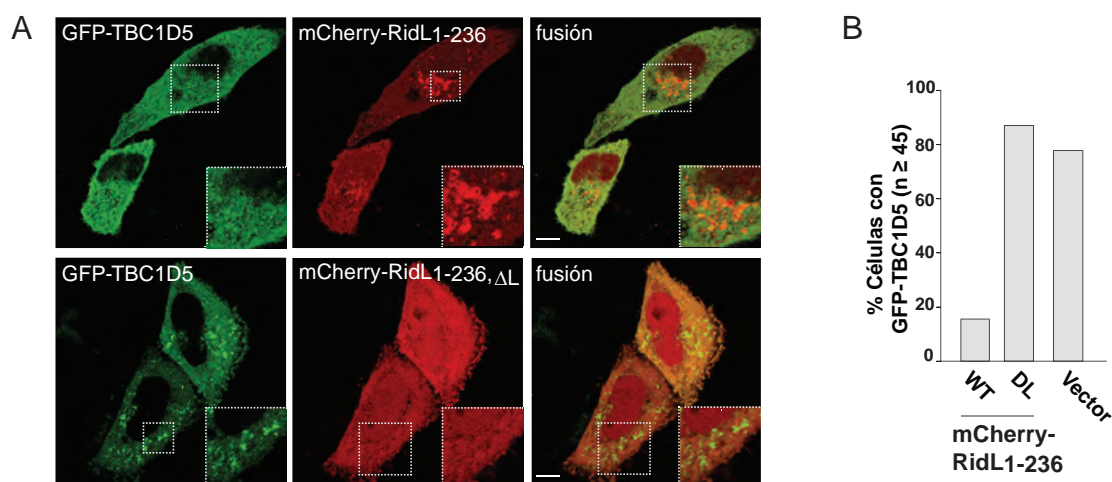


Figura 30. RidL desplaza a TBC1D5 de su unión con el retrómero en la membrana de los endosomas. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células Hela sobreexpresando mCherry-RidL $_{1-236}$ y mCherry-RidL $_{1-236, \Delta}$ L. Las células fueron cotransfectadas con plásmidos que codifican GFP-TBC1D5 y mCherry-RidL $_{1-236}$ o mCherry-RidL $_{1-236, \Delta}$ L. Las imágenes fueron tomadas 24 horas después. Los cuadrados muestran el reclutamiento de mCherry-RidL $_{1-236}$ o GFP-TBC1D5

a los endosomas. (B) Análisis de la presencia de GFP-TBC1D5 en las membranas intracelulares. El gráfico de barras representa el porcentaje de células que mostraron GFP-TBC1D5 asociado a la membrana de los endosomas. El recuento se realizó en un mínimo de 45 células para cada experimento.

Para evaluar la competición de RidL con VARP en solución, se utilizó el mismo experimento empleado con TBC1D5. Sin embargo, se usó el subcomplejo del retrómero formado por VPS29 y VPS35 debido a la imposibilidad de separar la subunidad VPS26 (38458 Da) de VARPc (38602 Da) en los geles SDS/PAGE y de esta manera facilitar la visualización de las proteínas. Este experimento mostró que la incubación de RidL con el complejo preformado VPS29-VPS35-VARPc (fig. 31A) desplazó a VARPc de la unión con el retrómero y en su lugar se formó el complejo VPS29-VPS35-RidL (fig. 31B-C). Por el contrario, RidL Δ L no fue capaz de reemplazar a VARPc (fig. 31B-C). De igual forma, VARPc no pudo desensamblar el complejo de RidL-VPS29-VPS35 (fig. 31D-E). Estos resultados confirmaron que RidL también compite de manera eficiente con VARPc por unirse al retrómero en solución.

No obstante, el efecto causado por RidL *in vivo*, únicamente provocó el desplazamiento parcial de VARP de la membrana de los endosomas. A pesar de que la cantidad observada de VARP-GFP fue menor en las células que sobreexpresaron mCherry-RidL₁₋₂₃₆ que en las que sobreexpresaron mCherry-RidL_{1-236, Δ L}, se pudo cuantificar la presencia de una fracción significativa de VARP-GFP asociada a los endosomas (fig. 32A-B). Este experimento puso de manifiesto que VARP posee factores adicionales al retrómero para su reclutamiento a la membrana de los endosomas. De modo que, aunque RidL es capaz de competir con VARP para unirse al retrómero, su permanencia en la membrana de estos orgánulos no se ve altamente comprometida por la presencia de RidL.

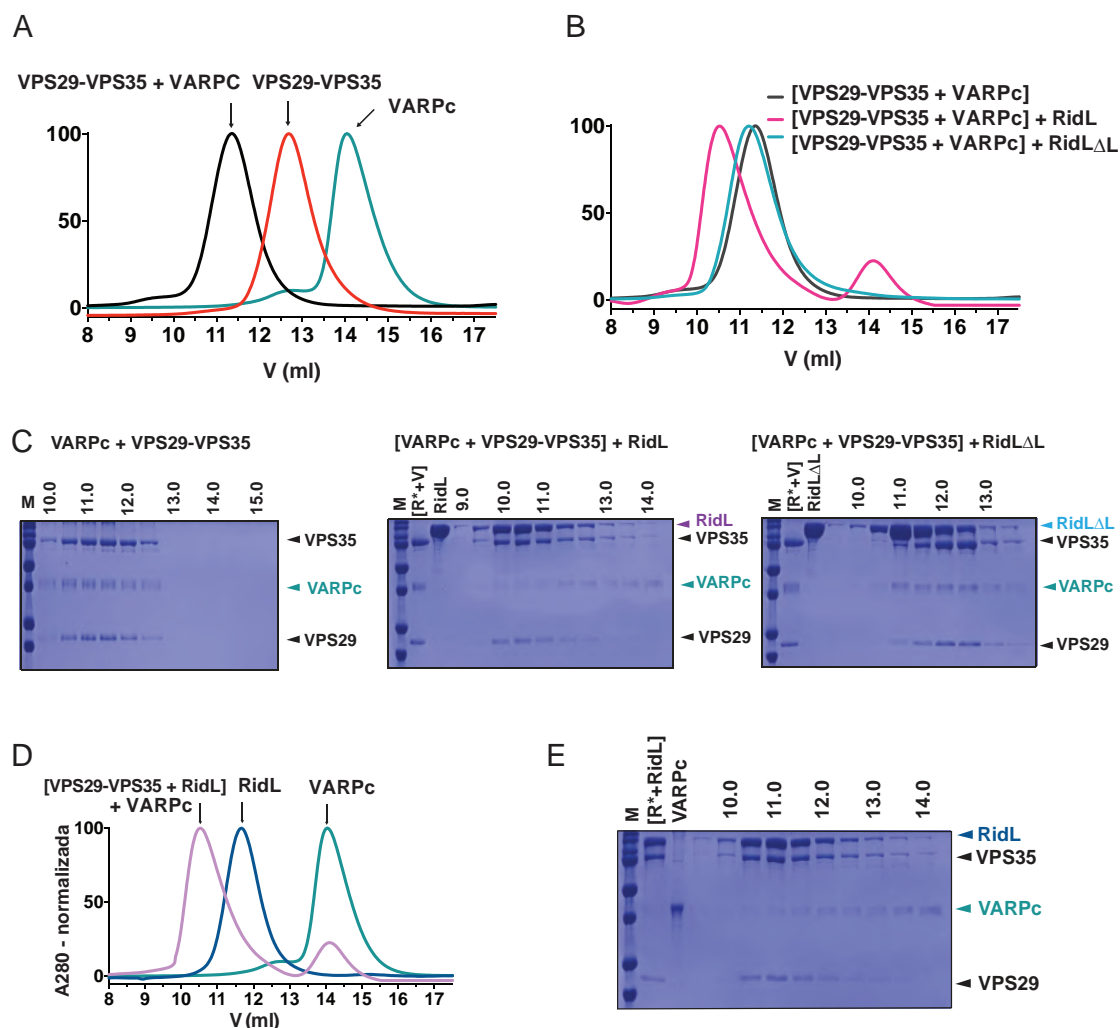


Figura 31. RidL compete con VARPc por el mismo sitio de unión a VPS29. (A) Cromatograma correspondiente al complejo (negro) formado por el VPS29-VPS35 (rojo) y VARPc (verde) a un ratio molar 1:1.5. (B) Ensayo de competición entre RidL y VARPc para unirse al subcomplejo del retrómero VPS29-VPS35. Cromatograma resultante después de mezclar el complejo VPS29-VPS35-VARPc (negro) con RidL (magenta) y RidL Δ L (cian) a un ratio molar 1:1. (C) Geles SDS/PAGE correspondientes a las fracciones de los diferentes cromatogramas. La posición de cada proteína aparece indicada en la parte derecha. (D) VARPc no es capaz de desplazar el complejo formado por RidL y el retrómero. Cromatograma resultante después de mezclar el complejo RidL-retrómero con VARPc (rosa) a un ratio molar 1:1. Para su comparación se indican los cromatogramas pertenecientes a RidL (azul) y VARPc (verde). (E) Gel SDS/PAGE correspondiente a las fracciones del cromatograma del ensayo de competición. La posición de cada proteína aparece indicada en la parte derecha.

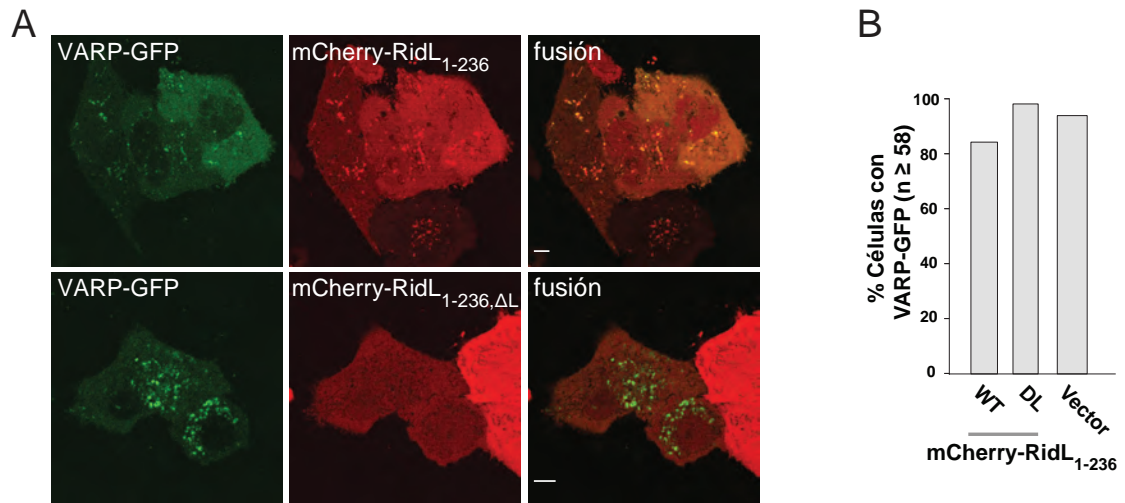


Figura 32. RidL desplaza parcialmente a VARP-GFP de la membrana de los endosomas. (A) Imágenes de microscopía de fluorescencia de células HeLa sobreexpresando mCherry-RidL₁₋₂₃₆ y mCherry-RidL_{1-236,ΔL}. Las células fueron cotransfectadas con plásmidos que codifican VARP-GFP y mCherry-RidL₁₋₂₃₆ o mCherry-RidL_{1-236,ΔL}. Las imágenes fueron tomadas 24 horas después. (B) Análisis de la presencia de GFP-TBC1D5 en las membranas intracelulares. El gráfico de barras representa el porcentaje de células que mostraron GFP-TBC1D5 asociado a la membrana de los endosomas. El recuento se realizó en un mínimo de 58 células para cada experimento.

4.2. Estudio de la interacción entre el retrómero y la subunidad FAM21 del complejo WASH

4.2.1. FAM21 interacciona con VPS29 a través de su extremo C-terminal

FAM21 es una proteína formada por un dominio globular, situado en la región N-terminal y que comprende los 200 primeros aminoácidos, seguido por una región desestructurada que posee 21 repeticiones del motivo L-F-acidic₃₋₁₀-L-F. Se ha descrito que su unión con el retrómero ocurre principalmente a través de los motivos L-F-acidic₃₋₁₀-L-F con la subunidad VPS35. Sin embargo, también se ha sugerido la posibilidad de que FAM21 interaccione con VPS29, a pesar de que su unión con VPS29 no permita retener de manera eficiente el complejo en solución (79).

El motivo conservado P-L/I, presente en RidL, TBC1D5 y los dos dominios ricos en cisteínas de VARP, es clave en la interacción con el retrómero a través de VPS29. Para confirmar la presencia del motivo consenso de unión a VPS29 en FAM21, se realizó una búsqueda en sus diferentes dominios repetidos. Mediante alineamientos de secuencia se identificó la presencia de este motivo en la repetición situada en el extremo C-terminal de FAM21 (FAM21-R21) (fig. 33). Este resultado sugiere la posibilidad de que FAM21-R21 pudiese interactuar con VPS29, implicando una interacción binaria de FAM21 con VPS29 y VPS35, similar a la descrita en TBC1D5.

RidLloop	176	N I A K P P I T P T Y E E	162
TBC1D5	136	L M I N N P L S Q D E G S	148
VARPc1	428	Q K M C H P L C F C D D C	440
VARPc2	708	P E F C H P L C Q C P K C	720
FAM21-R21	1329	N I F D D P L N A F G G Q	1341

Figura 33. FAM21 posee el motivo conservado P-L en su extremo C-terminal (R21). Alineamiento de secuencia del “hairpin loop” de RidL, la región Ins1 de TBC1D5, los dos dominios ricos en cisteínas de VARP y la repetición R21 de FAM21. Los residuos conservados aparecen recuadrados.

La hipótesis de que el motivo R21 de FAM21 se une al retrómero a través de VPS29 se confirmó mediante las medidas de ITC realizadas entre esta región (FAM21-R21) y VPS29 (fig. 34A). La afinidad de FAM21-R21 por VPS29 se encuentra en el rango de micromolar ($K_d = 22\mu\text{M}$) y de la misma forma que RidL, TBC1D5 y VARP involucra el conjunto de residuos hidrofóbicos presentes en la superficie conservada de VPS29 (fig 34A). A pesar de que su afinidad es menor, los mutantes puntuales de VPS29 (Y163A, Y165A y L152E) también inhibieron completamente la formación del complejo. Además, se comprobó por ITC que la asociación de FAM21-R21 con VPS29 implica a la leucina 1335 (fig. 34A), ya que su sustitución por glutámico inhibe completamente la interacción. Este resultado posiciona nuevamente al motivo conservado P-L en el eje de la interacción y por tanto, sugiere un patrón de unión a VPS29 similar al de las proteínas anteriormente descritas. Con el fin de analizar si existen más subunidades del retrómero implicadas en la interacción con el motivo R21 de FAM21 se comparó la afinidad de esta región por VPS29, VPS29-VPS35C y el retrómero. Los parámetros termodinámicos obtenidos fueron prácticamente idénticos, presentando todos los experimentos una constante de disociación (K_d) de $22\mu\text{M}$ (fig. 34B-C). Además, la afinidad de FAM21-R21 frente a los mutantes puntuales del retrómero, VPS26-VPS29_{Y165A}-VPS35 y VPS26-VPS29_{Y163A}-VPS35, quedó completamente suprimida (fig. 34B). Estos resultados indicaron que la unión del motivo R21 de FAM21 con el retrómero ocurre a través de VPS29 y que el resto de subunidades no contribuyen de manera significativa en la interacción.

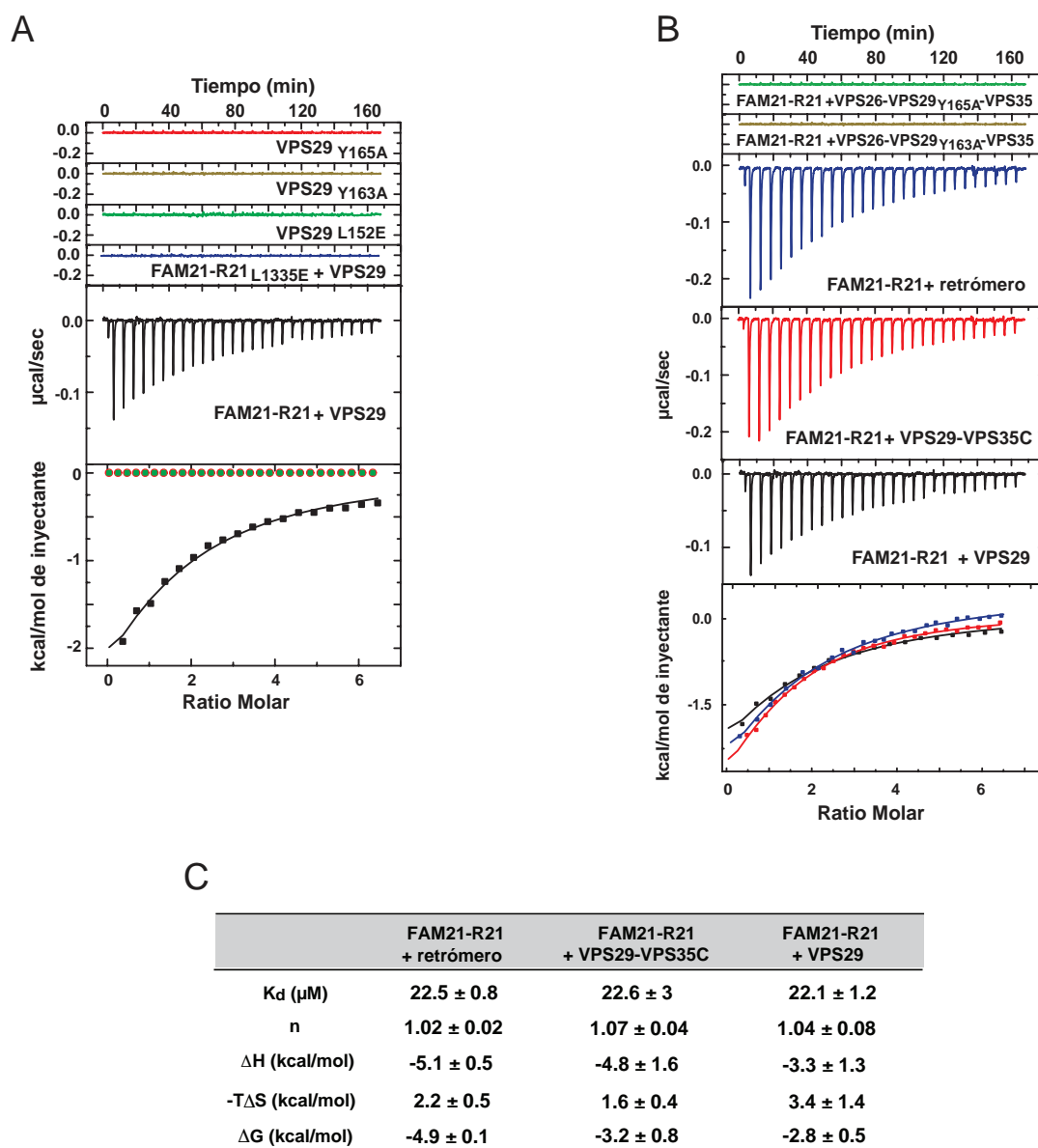


Figura 34. FAM21 interacciona con los residuos hidrofóbicos Y165A, Y163A y L152E de VPS29 a través del motivo P-L situado en su extremo C-terminal R21. (A) Análisis de la interacción de FAM21-R21 con VPS29 mediante ITC. Isotherma de la titulación del FAM21-R21 frente a VPS29 (negro) y los diferentes mutantes de esta proteína Y165A (rojo), Y163A (marrón) y L152E (verde). En azul aparece la titulación del mutante puntual de FAM21, L1335E, frente a VPS29. (B) Isotherma de la calorimetría de titulación de FAM21-R21 frente a retrómero (azul), retrómero incluyendo el mutante puntual de VPS29_{Y165A} (verde) y retrómero con VPS29_{Y163A} (marrón), así como frente a VPS29-VPS35C (rojo) y VPS29 (negro). (C) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas. La constante de disociación (K_d), la estequiometría de la reacción (n), la variación de la entalpía (ΔH), la variación de la entropía ($-T\Delta S$) y la variación de la energía libre de Gibbs (ΔG) fueron calculados a partir de un mínimo de tres réplicas para cada uno de los experimentos realizados. Los valores indicados representan la media y la desviación estándar.

4.2.2. El motivo R20 de FAM21 interacciona con VPS35

Se ha descrito que la unión de FAM21 con el retrómero ocurre principalmente a través de los motivos L-F-acidic₃₋₁₀-L-F, situados en su extremo C-terminal (79). Esta región comprende las repeticiones R20 y R21 y constituye el núcleo central de la interacción, a pesar de que el resto de repeticiones también contribuyen de manera parcial a la unión con el retrómero (88). Es por ello que se clonó, sobreexpresó y purificó la región de FAM21 que comprende los motivos R20 y R21 (FAM21-R2021) y se comparó la afinidad de este fragmento por el retrómero con la de FAM21-R21. Las medidas de ITC realizadas entre FAM21-R2021 y retrómero mostraron una constante de disociación (K_d) de 8.5 μM (fig. 35A). Este valor es 2.5 veces más afín que el obtenido con FAM21-R21 (22.5 μM), indicando que el motivo R20 también contribuye a la asociación con el retrómero. Una vez determinada experimentalmente la unión de FAM21-R2021 con el retrómero, se analizó la subunidad o subunidades del retrómero implicadas en la interacción con esta región de FAM21. Para ello, se comparó la constante de disociación calculada a partir de las medidas de ITC entre FAM21-R2021 y VPS29 con la de los experimentos de FAM21-R21 (fig. 35B-C). Los parámetros termodinámicos obtenidos con FAM21-R2021 fueron prácticamente idénticos a los de FAM21-R21, presentando una constante de disociación (K_d) de 21.5 μM en el caso de FAM21-R2021 y de 22.1 μM en el caso de FAM21-R21. Ambos valores de K_d se encuentran en el mismo rango, indicando que la unión de FAM21-R2021 con VPS29 únicamente se da a través del motivo R21. Además, el claro incremento de afinidad de FAM21-R2021 por el retrómero en comparación con FAM21-R21, pone de manifiesto la interacción del motivo R20 a través de VPS35. En consecuencia, estos resultados mostraron que FAM21-R2021 se asocia con el retrómero a través de VPS29 y VPS35. La estequiometría de la reacción (n) también corroboró estos datos al poner de manifiesto la existencia de dos sitios de unión ($n=0.51$) entre FAM21-R2021 y el retrómero.

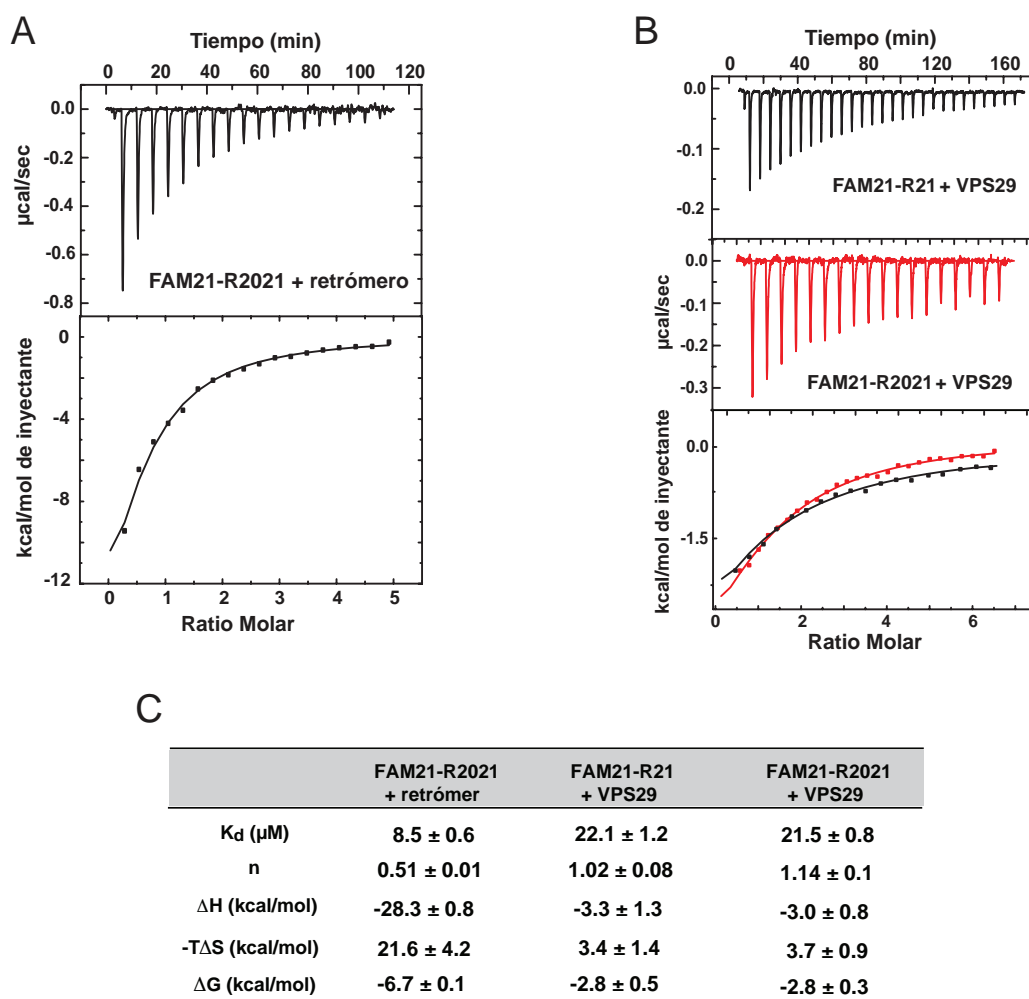
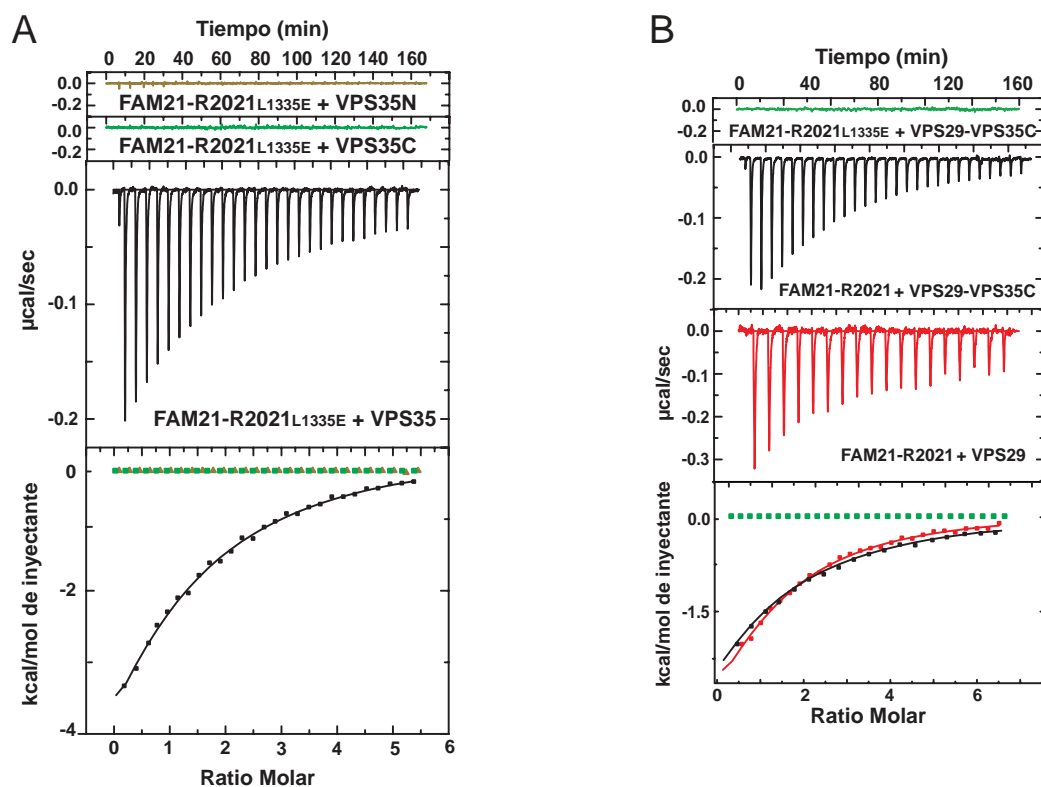


Figura 35. FAM21-R2021 interacciona con el retrómero a través de VPS29 y VPS35. (A) Análisis de la interacción de FAM21-R2021 con el retrómero mediante ITC. (B) Isotherma de la calorimetría de titulación de FAM21-R21 (negro) y FAM21-R2021 (rojo) frente a VPS29. (C) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas. Los valores indicados representan la media y la desviación estándar de un mínimo de tres réplicas para cada experimento.

Para confirmar la interacción del motivo R20 a través de VPS35 se calculó la afinidad entre ambas proteínas. No obstante, ante la imposibilidad de sobreexpresar de manera soluble el constructo correspondiente a la repetición R20, este experimento se desarrolló utilizando el fragmento FAM21-R2021, en el cual se introdujo el mutante puntual de R21 que abolió completamente su interacción con VPS29 (R21_{L1335E}). De esta forma, la unión de este nuevo constructo (FAM21-R2021_{L1335E}) con el retrómero únicamente implica el motivo

R20. La constante de disociación entre FAM21-R2021_{L1335E} y VPS35 se situó en el rango de micromolar (26.5 μM) con una estequiometría de 1, confirmando su interacción con VPS35 a través de un único sitio de unión situado en el motivo R20 (fig. 36A-C). Para analizar la región de VPS35 implicada en la asociación con el motivo R20 se comparó la afinidad de la región N-terminal de VPS35 (VPS35N, aminoácidos 14-476) con la de su extremo C-terminal (VPS35C, aminoácidos 476-780). Sin embargo, las medidas de ITC realizadas entre FAM21-R2021_{L1335E} y ambas mitades de VPS35 mostraron una ausencia de interacción (fig. 36A). Este resultado pudo deberse a que el motivo R20 interacciona con la zona central de VPS35, la cual es flexible cuando sus diferentes regiones son expresadas de forma aislada. No obstante, el fragmento C-terminal de VPS35 si posee una conformación estable cuando es expresado junto a VPS29. Por consiguiente, se comparó la constante de disociación entre FAM21-R2021 y VPS29 con la obtenida entre FAM21-R2021 y VPS29-VPS35C (fig. 36B-C) y se analizó si existe una diferencia de afinidad debida a la presencia de VPS35C. Las constantes de disociación obtenidas fueron muy similares (21.5 μM vs 21.8 μM), indicando que el fragmento C-terminal de VPS35 no contribuye significativamente en la interacción con FAM21-R2021. Así mismo, la afinidad del constructo FAM21-R2021_{L1335E} por VPS29-VPS35C fue inapreciable (fig. 36B), corroborando nuevamente que el motivo R20 no interacciona con el fragmento C-terminal de VPS35. Todos estos resultados sugieren que la interacción de R20 con el retrómero tiene lugar en la zona central de VPS35. La distancia existente entre la superficie hidrofóbica de VPS29 y la región central de VPS35 ($\sim 30 \text{ \AA}$) es compatible con los 24 residuos que conectan la leucina 1335 con el extremo N-terminal de R20, asumiendo una estructura extendida en forma de "loop".



	K_d (μM)	n	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
VPS35N ₁₄₋₄₇₀ + FAM21-R2021 _{L1335E}	N.B.				
VPS35C ₄₇₆₋₇₈₀ + FAM21-R2021 _{L1335E}	N.B.				
VPS35 + FAM21-R2021 _{L1335E}	26.5 ± 1.03	1.02 ± 0.2	-11.2 ± 0.3	5.0 ± 0.8	-6.24 ± 0.3
VPS29+VPS35C + FAM21-R2021	21.8 ± 1	1.02 ± 0.1	-4.2 ± 0.5	2.5 ± 0.4	-3.2 ± 0.8
VPS29 + FAM21-R2021	21.5 ± 0.8	1.14 ± 0.1	-3.0 ± 0.8	3.7 ± 0.9	-2.8 ± 0.3
VPS29+VPS35C + FAM21-R2021 _{L1335E}	N.B.				

Figura 36. El motivo R20 de FAM21 interacciona a través VPS35. (A) Análisis de la interacción de FAM21-R2021_{L1335E} con VPS35 mediante ITC. Isotherma de la titulación de FAM21-R2021_{L1335E} frente a la región N-terminal de VPS35 (aminoácidos 14-470) (marrón), la región C-terminal VPS35C (aminoácidos 476-780) (verde) y la forma nativa de VPS35 (negro). (B) Isotherma de la titulación de FAM21-R2021 frente a VPS29-VPS35C (negro) y VPS29 (rojo). En verde aparece la titulación del mutante puntual FAM21-R2021_{L1335E} frente al subcomplejo VPS29-VPS35C. (C) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas. Los valores indicados representan la media y la desviación estándar de un mínimo de tres réplicas para cada experimento.

4.2.3. El mutante de VPS35 D620N, implicado en la enfermedad de Parkinson, no inhibe la asociación de FAM21-R2021 con el retrómero

La mutación puntual de VPS35 situada en el residuo 620 que implica el cambio de un aspártico (D) por una asparagina (N) ha sido relacionada con una forma de enfermedad de Parkinson presente en aproximadamente el 1.3% de los casos hereditarios y el 0.3% de los casos esporádicos (87). La implicación de esta mutación en el desarrollo de la enfermedad no ha sido clarificada hasta el momento aunque una de las explicaciones más aceptadas es que altera la actividad del complejo WASH a través de la interacción de VPS35 con FAM21 (88). Sin embargo, los datos obtenidos en el apartado anterior mostraron que la región C-terminal de VPS35 donde se localiza esta mutación no participa en la interacción principal de FAM21 con el retrómero. Es por ello que se decidió comprobar experimentalmente si la presencia de esta mutación inhibe la unión de FAM21-R2021 con el retrómero. Para ello, se comparó la afinidad de FAM21-R2021 por la forma nativa del retrómero con la del retrómero en el que se introdujo la mutación puntual VPS35_{D620N}. La constante de disociación y los parámetros termodinámicos obtenidos fueron prácticamente idénticos (8.5 μ M vs 9.5 μ M), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos (fig. 37A, C). Este resultado demostró que, al menos en solución, la presencia de la mutación en VPS35, D620N, no afecta a la asociación de FAM21-R2021 con el retrómero.

Adicionalmente, para analizar si la mutación puntual VPS35_{D620N} compromete la formación del heterotr trímero del retrómero, se comprobó la capacidad de VPS35_{D620N} para formar complejo con VPS29 (fig. 37B, D). La afinidad de VPS29 por la forma nativa de VPS35 y el mutante puntual VPS35_{D620N} se situó en el mismo rango (83.9 nM vs 71.8 nM), indicando que la presencia de la mutación no afecta de manera importante la formación del complejo entre VPS29 y VPS35. La implicación de esta mutación en la asociación de VPS35 con VPS26 no se analizó debido a que la región C-terminal de VPS35, donde se ubica el residuo 620, no participa en la unión con esta subunidad. Por tanto, los resultados obtenidos permitieron determinar que la mutación VPS35_{D620N} no perturba la formación del heterotr trímero del retrómero en solución.

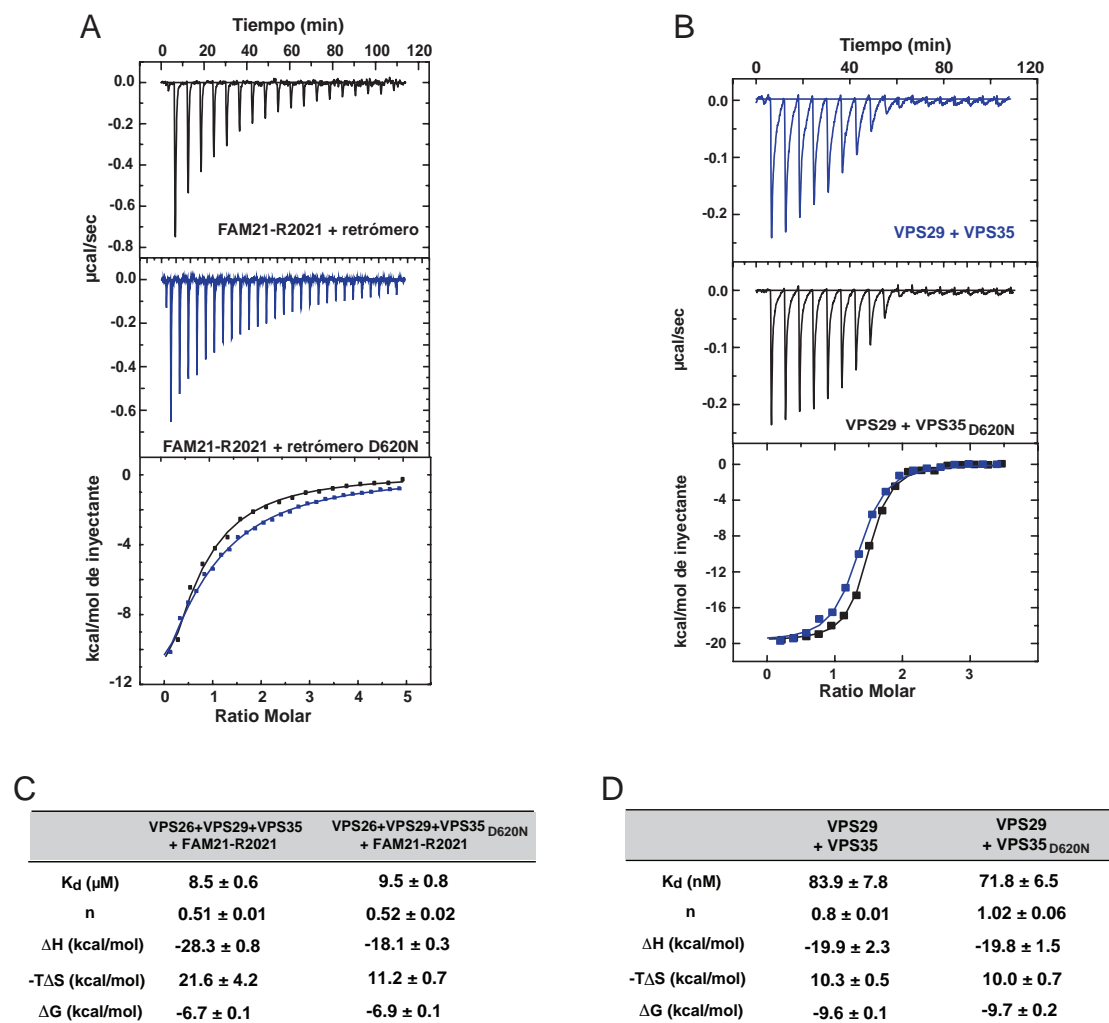


Figura 37. La mutación puntual D620N en VPS35 no afecta a su unión con FAM21-R2021. (A) Isotherma de la titulación de FAM21-R2021 frente a retrómero (negro) y el mutante puntual de retrómero VPS26-VPS29-VPS35_{D620N} (azul). (B) Análisis de la interacción entre VPS29 y VPS35 mediante ITC. Isotherma de la titulación de VPS29 frente a la forma nativa de VPS35 (azul) y el mutante puntual de VPS35 D620N (negro). (B-C) Parámetros termodinámicos calculados a partir de las medidas de ITC realizadas. Los valores indicados representan la media y la desviación estándar de un mínimo de tres réplicas para cada experimento.

4.3. Análisis estructural de la interacción entre el retrómero y cargos relevantes en la enfermedad de Alzheimer como BACE y APP

4.3.1. BACE, APP y DMT1 comparten el mismo sitio de unión al retrómero situado en la interfase de VPS26 y SNX3

El retrómero, junto con sus proteínas SNXs asociadas, controla el reciclaje de multitud de cargos presentes en los endosomas a la membrana plasmática, la red *trans*-Golgi y diferentes orgánulos distales (23). La disfunción de este complejo proteico ha sido ampliamente relacionada con enfermedades neurodegenerativas como alzhéimer y párkinson. En la enfermedad de Alzheimer varias SNXs regulan la producción del péptido β -amiloide mediante la interacción con BACE y APP (81). Sin embargo, no existen evidencias estructurales de la interacción de estos cargos con el retrómero.

Estudios previos consiguieron caracterizar la interacción del motivo canónico $\emptyset X[L/M]$ (donde \emptyset es un aminoácido aromático y X cualquier aminoácido), presente en numerosos cargos cuyo tráfico depende del retrómero, con VPS26 y SNX3 (56). Mediante alineamientos de secuencia no se pudo identificar la presencia del motivo canónico en BACE y APP (fig. 38). Sin embargo, la existencia, en ambos cargos, de una leucina en la posición central precedida por una arginina nos sugirió la posibilidad de que BACE y APP podrían seguir un mecanismo de unión similar al empleado en el reconocimiento del transportador de cationes divalentes DMT1.

DMT1	553	E L Y L L N T M	560
BACE1	480	Q W R C L R C L	487
APP	745	E E R H L S K M	752

Figura 38. BACE y APP no comparten el motivo conservado $\emptyset X[L/M]$. Alineamiento de secuencia del motivo conservado $\emptyset X[L/M]$ de DMT1 con BACE y APP. Los residuos conservados se indican en amarillo mientras que los no conservados se muestran en gris.

Para confirmar esta hipótesis, se decidió caracterizar la interacción de BACE y APP con el retrómero mediante cristalografía de rayos X. Para ello, se diseñaron péptidos de longitud similar al péptido de DMT1 empleado para resolver la

estructura VPS26-VPS35N-SNX3-DMT1, y se cristalizaron en complejo con VPS26-VPS35N y SNX3 siguiendo la misma metodología (56). La estructura del complejo cuaternario de VPS26, la región N-terminal de VPS35 (VPS35N, aminoácidos 14-470) y SNX3 junto a BACE se resolvió a 2.6 Å de resolución mientras que la estructura de este mismo subcomplejo de retrómero en presencia de APP se consiguió a 3.0 Å de resolución (Tabla9). En ambas estructuras, se obtuvo una clara densidad electrónica correspondiente a los péptidos (BACE₄₈₀₋₅₀₂ y APP₇₃₉₋₇₅₈), localizada en la interfase de VPS26 y SNX3. Esta región de interacción es la misma en la que se identificó la presencia de DMT1, confirmando que estos tres cargos comparten el mismo sitio de unión para asociarse con el retrómero (fig. 39). Para la asignación de la secuencia de BACE₄₈₀₋₅₀₂ y APP₇₃₉₋₇₅₈ se utilizó selenometionina como marcador de posición. Debido a la ausencia de metioninas en la secuencia de BACE₄₈₀₋₅₀₂, la leucina 486 se sustituyó por una metionina (BACE_{480-502, L486M}). La señal anómala del selenio permitió confirmar claramente la posición de los diferentes residuos de BACE₄₈₀₋₅₀₂ y APP₇₃₉₋₇₅₈ unidos a la interfase de VPS26 y SNX3 (fig. 40, 41).

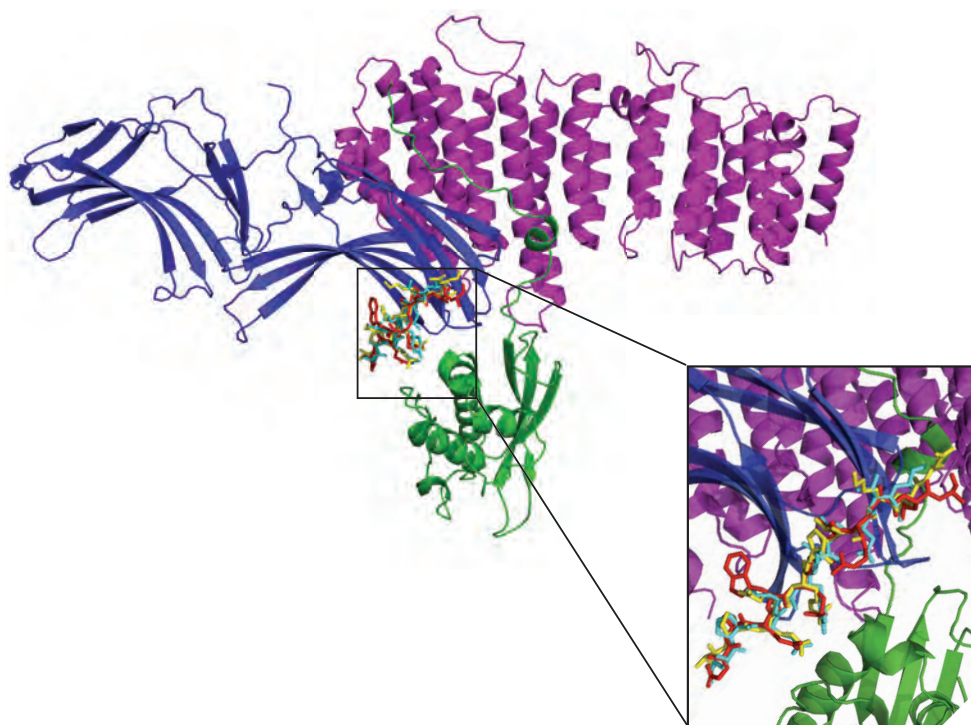


Figura 39. BACE, APP y DMT1 comparten el mismo sitio de unión con el retrómero. Superposición de la estructura del complejo formado por VPS26 (azul), VPS35N (morado) y SNX3 (verde) en presencia de BACE (rojo), APP (amarillo) y DMT1 (cian). La región de interacción, situada en la interfase de VPS26 y SNX3, se muestra de manera ampliada en el interior del recuadro.

Tabla 9. Estadísticas de la colecta de datos y el refinamiento de los complejos VPS26-VPS35N-SNX3-BACE₄₈₀₋₅₀₂ y VPS26-VPS35N-SNX3-APP₇₃₉₋₇₅₈.

	VPS26 VPS35₁₄₋₄₇₀ SNX3 BACE₄₈₀₋₅₀₂	VPS26 VPS35₁₄₋₄₇₀ SNX3 APP₇₃₉₋₇₅₈
<u>Colecta de datos</u>		
Grupo espacial	C2	C2
Celda unidad		
a, b, c (Å)	372.5, 75.4, 57.8	368.5, 75.2, 57.6
α, β, γ (°)	90.0, 98.5, 90.0	90.0, 97.3, 90.0
Resolución	49.5 - 2.6 (2.8-2.6)	47.9 - 3.0 (3.3-3.0)
R_{meas}	0.12 (1.52)	0.15 (1.30)
CC_{1/2} (%)	99.8 (37.8)	99.9 (34.3)
I/σ'	9.8 (0.9)	6.5 (0.9)
Completeza (%)	100 (100)	100.0 (99.7)
Redundancia	12.4 (13.9)	11.4 (14.0)
<u>Refinamiento</u>		
Nº. reflexiones	46155	47578
R_{work}/ R_{free}	24.3/25.4	24.9/29.4
<u>Nº. átomos</u>		
Proteína	7555	7567
Ligando/Iones	108/50	104/31
Aguas	41	
<u>Factor B</u>		
Proteína	71.9	85.2
Iones		
Longitud de enlace	0.002	0.003
Longitud de ángulo	1.0	1.1

* La capa de mayor resolución se muestra entre paréntesis

4.3.2. Mecanismo de reconocimiento de BACE y APP

La estructura del complejo VPS26-VPS35N-SNX3-BACE₄₈₀₋₅₀₂ reveló que el péptido BACE₄₈₀₋₅₀₂ adopta una conformación extendida como resultado de su unión con el retrómero (fig. 40). La parte central de la interacción se da a través de la leucina 486, la cual se encuentra completamente insertada en la superficie hidrofóbica de VPS26 localizada entre las hélices β10 y β18. Además, la interacción de los residuos W483, R487 y L489 contribuye en la estabilización de la unión de BACE₄₈₀₋₅₀₂ con VPS26. La asociación BACE₄₈₀₋₅₀₂ con SNX3 se produce mediante los residuos R484 y Q482, permitiendo su acomodación en la interfase de VPS26 y SNX3 (fig. 42A).

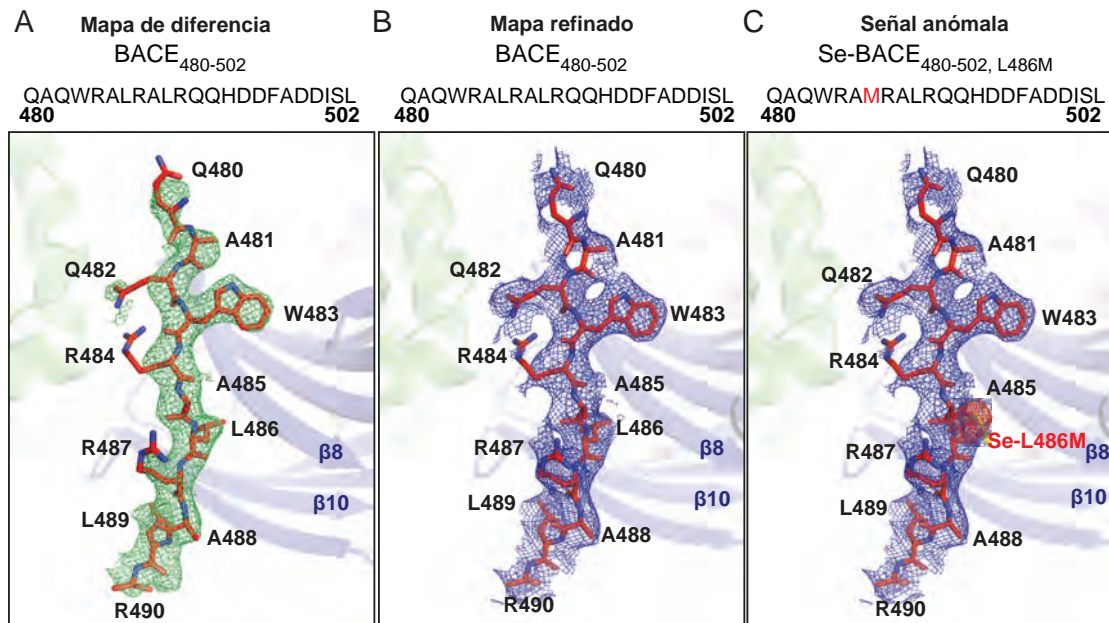


Figura 40. Identificación del sitio de unión de BACE con VPS26 y SNX3. (A) Mapa de diferencia (F_o-F_c), en verde, del péptido BACE₄₈₀₋₅₀₂ contorneado a 2.0σ . (B) Mapa refinado ($2F_o-F_c$), en azul, del péptido BACE₄₈₀₋₅₀₂, contorneado a 1.5σ . (C) Mapa refinado ($2F_o-F_c$), en azul, del péptido BACE_{480-502, L486M} derivatizado con selenometionina. La señal anómala correspondiente a la selenometionina se representa en rojo. En todos los casos la parte superior muestra la secuencia correspondiente al péptido cristalizado mientras que en el interior del recuadro se indican los diferentes residuos que pudieron ser modelados. Las hélices $\beta 10$ y $\beta 18$ de VPS26 se indican en color azul.

La estructura del complejo formado por VPS26, VPS35N, SNX3 y APP₇₃₉₋₇₅₂ mostró que el péptido, APP₇₃₉₋₇₅₂, adopta una conformación elongada similar a la de BACE₄₈₀₋₅₀₂ (fig. 41). Su reconocimiento se da principalmente a través de la Leucina 749, la cual se posiciona en la región central de la interacción. Adicionalmente, la superficie hidrofóbica de VPS26, situada entre las hélices $\beta 10$ y $\beta 18$, establece contactos con los residuos E746, H748 y M752, permitiendo estabilizar la unión del APP₇₃₉₋₇₅₂. Su interacción a través de SNX3 se produce mediante los residuos E745 y R747 (fig. 42B).

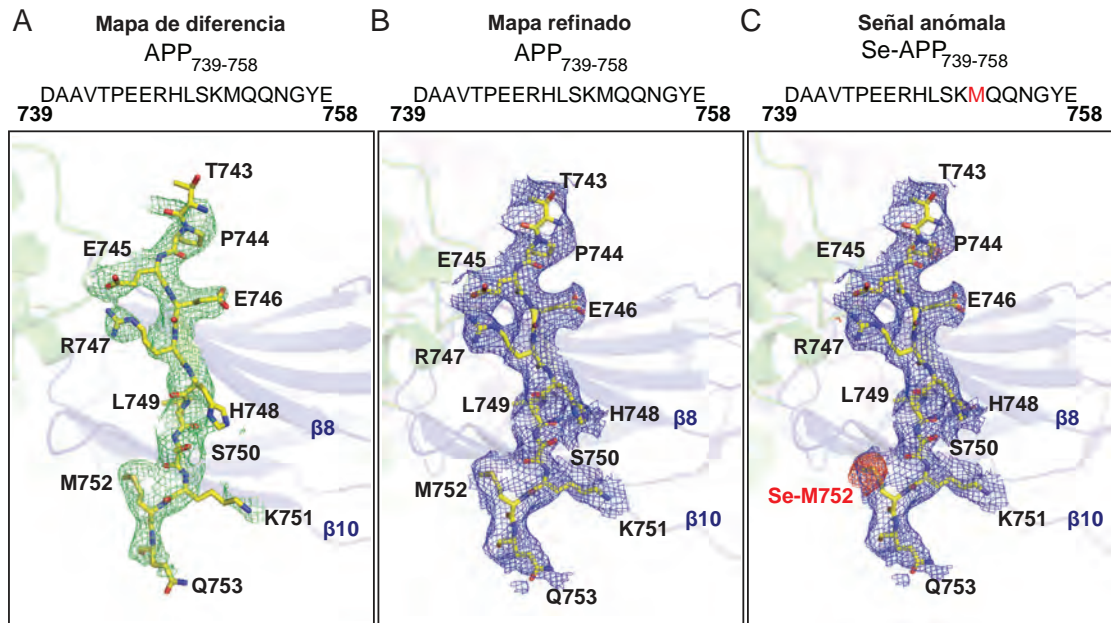


Figura 41. Identificación del sitio de unión de APP con VPS26 y SNX3. (A) Mapa de diferencia ($F_0 - F_c$), en verde, del péptido APP₇₃₉₋₇₅₈ contorneado a 2.0σ . (B) Mapa refinado ($2F_0 - F_c$), en azul, del péptido APP₇₃₉₋₇₅₈, contorneado a 1.5σ . (C) Mapa refinado ($2F_0 - F_c$), en azul, del péptido APP₇₃₉₋₇₅₈ derivatizado con selenometionina. La señal anómala correspondiente a la selenometionina se representa en rojo. En todos los casos la parte superior muestra la secuencia correspondiente al péptido cristalizado mientras que en el interior del recuadro se indican los diferentes residuos que pudieron ser modelados. Las hélices $\beta 10$ y $\beta 18$ de VPS26 se indican en color azul.

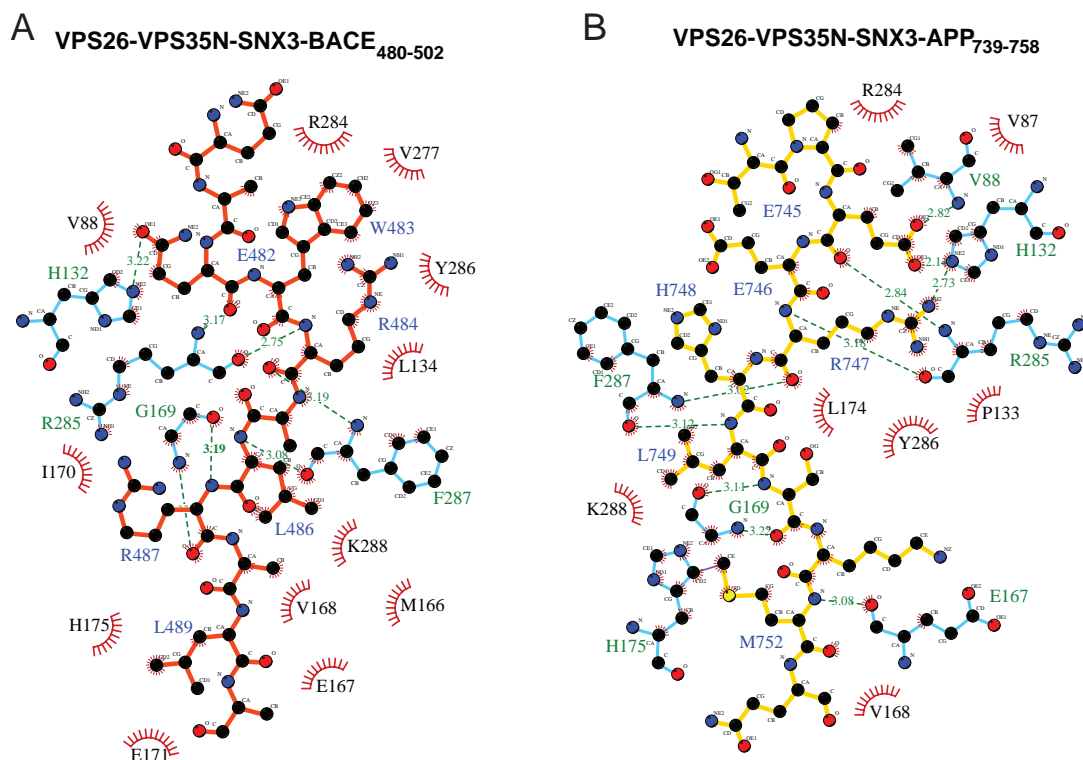


Figura 42. Diagrama “Ligplot” ilustrando las interacciones de (A) BACE₄₈₀₋₅₀₂ y (B) APP₇₃₉₋₇₅₈ con VPS26 y SNX3. Los péptidos se representan en naranja (BACE₄₈₀₋₅₀₂) y amarillo (APP₇₃₉₋₇₅₈), mientras que los residuos clave de VPS26 y SNX3 que establecen enlaces de hidrógeno se indican en cian. Los aminoácidos de SNX3 y VPS26 con interacciones hidrofóbicas se muestran como rayos rojos que irradian hacia los átomos del péptido con los que mantienen contacto. El nombre de los residuos clave de los péptidos aparece en azul y los de VPS26 y SNX3 se indican en verde y negro, respectivamente.

En resumen, los datos cristalográficos obtenidos muestran que la unión de BACE y APP se da a través de la superficie situada entre VPS26 y SNX3. En ambos casos, la interacción principal con VPS26 implica la presencia de una leucina (L486 y L749) en la región central, mientras que la asociación con SNX3 se da a través de una arginina (R484 y R747). Estos resultados permiten confirmar que BACE y APP comparten un patrón común de interacción con el retrómero en el que el motivo conservado R-X-L juega un papel esencial.

Durante la escritura de esta tesis, estos datos estructurales están siendo validados mediante ensayos de interacción *in vivo*, en colaboración con el grupo del Dr. Juan Bonifacino (NIH)

Discusión

5. Discusión

Las células eucariotas se caracterizan por contener compartimentos delimitados por membranas cuya composición está controlada principalmente mediante el tránsito de biomoléculas a través de vesículas de transporte. Existen numerosos complejos multiproteicos que, junto con proteínas reguladoras, controlan cada una de las etapas del tráfico vesicular. El retrómero participa en múltiples eventos de este proceso, controlando el reciclaje de cargos presentes en los endosomas a la membrana plasmática, la red *trans*-Golgi, así como a diferentes orgánulos distales (23). Debido al papel crucial que desempeña el retrómero en la regulación del tráfico vesicular, no es de extrañar que numerosos patógenos intracelulares hayan adquirido mecanismos para manipular su actividad con el fin de evitar la degradación lisosomal llevada a cabo en el interior de la célula hospedadora (99). *Legionella pneumophila* es un ejemplo de patógeno oportunista que para replicarse en el interior de la célula hospedadora manipula la función del retrómero a través de la translocación de efectores (106). Uno de los primeros objetivos de este patógeno es la evasión de la vía degradativa lisosomal. Para ello, *Legionella pneumophila* remodela la membrana del fagosoma desplazando proteínas típicas de los endosomas tardíos y los lisosomas y sustituyéndolas por otras específicas de los LCVs (108). En este proceso la manipulación del retrómero es fundamental. En condiciones normales, el retrómero recluta a la membrana del fagosoma diferentes proteínas accesorias como TBC1D5, VARP y FAM21, que regulan el tráfico de vesículas (67, 74, 78). Sin embargo, durante el proceso infeccioso de *Legionella pneumophila* el retrómero es secuestrado a través de la unión con RidL (119). A pesar de la importancia biológica de la interacción RidL-retrómero en el proceso infeccioso de *Legionella pneumophila*, una de las cuestiones fundamentales antes de la realización de esta tesis era el mecanismo molecular por el cual RidL se asocia al retrómero, así como las implicaciones de esta unión en la célula hospedadora.

En el presente trabajo se ha realizado un análisis a nivel atómico y funcional del mecanismo mediante el cual el efector de *Legionella pneumophila*, RidL secuestra y manipula la actividad del retrómero para evadir la maduración del fagosoma.

RidL se utilizó como herramienta no sólo en el estudio de los mecanismos de patogenicidad de *Legionella pneumophila* sino también en la comprensión de las bases moleculares que rigen el reclutamiento de determinadas proteínas accesorias a la membrana de los endosomas. Para este fin, inicialmente se resolvió la estructura de RidL, tanto sólo como en complejo con las subunidades del retrómero VPS29 y VPS35C, y se determinó el mecanismo molecular a través del cual este efector se une a la membrana de los endosomas.

RidL adopta una conformación elongada en forma de S que no posee homología estructural ni de secuencia con otras proteínas. Su interacción con el retrómero se produce a través de la superficie conservada de VPS29 localizada en el extremo opuesto al de unión a VPS35. La región de RidL implicada en la asociación al retrómero incluye los aminoácidos comprendidos entre el 163 y 176, los cuales forman un “hairpin loop” cuya conformación de horquilla resulta ser esencial en la asociación con el retrómero. El reconocimiento de la superficie conservada de VPS29 por parte del “hairpin loop” ocurre principalmente a través de interacciones hidrofóbicas. La prolina 171 y la isoleucina 170, situadas en el extremo del “hairpin loop”, son los residuos clave al funcionar como “punta de lanza” en la interacción entre ambas proteínas.

El bolsillo hidrofóbico de VPS29, implicado en la interacción con RidL, está también involucrado en el reconocimiento de ligandos endógenos como TBC1D5 y VARP (65). De hecho, el modo de unión entre RidL y VPS29 es muy similar al de TBC1D5 (67), compartiendo un patrón común de interacción. Tanto RidL como TBC1D5 presentan una isoleucina o una leucina en el borde central del loop insertada en la superficie hidrofóbica de VPS29. Estos residuos están precedidos por una prolina, dando lugar al motivo conservado P-L/I, el cual representa el eje central de la interacción con VPS29. A pesar de que tanto TBC1D5 como VARP comparten el mismo sitio de unión, la afinidad de estos ligandos endógenos por VPS29 es mucho menor que la de RidL. Por consiguiente, RidL es capaz de competir de forma efectiva con TBC1D5 por unirse al retrómero tanto *in vivo* como *in vitro*. No obstante, a pesar de que RidL también desplaza a VARP de su unión con el retrómero en los ensayos *in vitro*, en células el efecto de RidL sobre

VARP es sólo parcial, sugiriendo la existencia de factores adicionales al retrómero para su reclutamiento a la membrana de los endosomas.

TBC1d5 es una proteína con actividad hidrolítica para Rab7 que regula negativamente el reclutamiento del retrómero a la membrana de los endosomas (73). En cambio, VARP es una proteína con múltiples dominios que posee actividad GEF (guanine nucleotide Exchange factor) para Rab32/38 y Rab21 y que, mediante su asociación con el R-SNARE VAMP7, participa en el tráfico de cargos hacia la membrana plasmática (74). Ambas proteínas poseen funciones totalmente distintas. La asociación de TBC1D5 inhibe la actividad del retrómero mientras que la unión de VARP intensifica el transporte de cargos hacia la membrana plasmática. Sin embargo, tanto TBC1D5 como VARP utilizan el mismo sitio de unión a VPS29 para su asociación con el retrómero. Es por ello, que entre estas dos proteínas accesorias existe una competición a la hora de unirse al retrómero, dando como resultado una relación mutuamente excluyente. La interacción de TBC1D5 promueve la disociación del retrómero evitando la unión de VARP, mientras que la asociación de VARP inhibe el reclutamiento de TBC1D5 (66). Por tanto, el sitio de unión de VPS29 parece actuar como un interruptor que regula la actividad del retrómero a través de interacciones excluyentes. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que RidL se une al sitio de unión de VPS29 usando el mismo mecanismo de interacción utilizado por proteínas accesorias como TBC1D5 y VARP. El mimetismo molecular que RidL consigue a través de su “hairpin loop” le permite unirse a VPS29 mediante el desplazamiento de estos ligandos endógenos y por consiguiente, le posibilita alcanzar de manera eficiente los subdominios endosomales donde se localiza esta subunidad. Adicionalmente, la reciente identificación del retriever, un heterotrímero similar al retrómero que también comparte la subunidad VPS29 pero que participa en diferentes rutas de reciclaje (138), pone de manifiesto que RidL podría asociarse con los endosomas a través de la unión con el complejo retriever y sugiere una mayor diversidad de eventos en los que VPS29 podría estar implicada.

Estudios realizados con anterioridad a este trabajo mostraron que la ausencia de ridL provoca un defecto en la replicación intracelular de *L. pneumophila* tanto en amebas como en mamíferos, mientras que la delección de las subunidades del retrómero, VPS26 y VPS29, estimula su crecimiento (119). Estos autores argumentan que la actividad normal del retrómero restringe la proliferación de *L. pneumophila* y que RidL es traslocado para contrarrestar su función. En contraposición, algunos de los datos obtenidos en nuestro trabajo señalan que RidL tiene un menor efecto sobre la actividad del retrómero del que indican estos autores. Por ejemplo, a pesar de que RidL, sobreexpresado en altos niveles, es capaz de competir con ligandos endógenos de manera altamente efectiva, en una situación real el número de moléculas de RidL translocadas por *Legionella pneumophila* es varios órdenes de magnitud inferior al de VPS29. Por tanto, aunque tenga lugar el desplazamiento de ligandos endógenos en una fracción de las moléculas de VPS29, es poco probable que RidL provoque un colapso total de la maquinaria de reciclaje. Además, los datos de SEC-MALS obtenidos demostraron que la unión de RidL permite la dimerización del retrómero, lo cual es clave para la formación de la cubierta. Por consiguiente, el retrómero podría ensamblarse en la membrana de las túbulo-vesículas incluso formando complejo con RidL. Por último, también se ha observado que RidL no impide la correcta localización del retrómero en la membrana de los endosomas ni la formación de túbulo-vesículas en estos compartimentos. En definitiva, los resultados descritos ponen de manifiesto que el tráfico retrógrado de moléculas podría desarrollarse con normalidad a pesar de la presencia de RidL en el interior celular. En conclusión, nuestros datos apoyan un mecanismo de unión de RidL a la membrana a través de VPS29 en lugar de una actividad inhibidora generalizada del tráfico mediado por el retrómero.

Especulando sobre la función de RidL durante el proceso infeccioso de *Legionella pneumophila* se podría decir que la interacción de RidL con VPS29 y posiblemente con otros factores todavía sin identificar le permitiría dirigirse de manera específica a la membrana de los LCVs. En esta localización, el desplazamiento de TBC1D5 y consiguiente mantenimiento de Rab7 evitaría su interacción con factores de amarre como HOPS-RILP. La unión del retrómero con

los complejos de amarre promueve la fusión con lisosomas (42). De esta forma, el reclutamiento selectivo de RidL a la membrana de los LCVs, a través de su unión con VPS29, impediría la fusión de lisosomas en estos compartimentos evitando la degradación de *Legionella pneumophila* en su interior. En todo caso, la función de RidL continúa siendo una incógnita y se necesitan más datos que apoyen esta hipótesis. En este sentido, la identificación de otras proteínas que interaccionen con RidL puede arrojar nuevas ideas acerca de su función durante la replicación intracelular de *Legionella pneumophila*. Los datos estructurales conseguidos en este trabajo abren la vía a este tipo de estudios, facilitando su caracterización.

Además de su papel en enfermedades infecciosas como la legionelosis, el retrómero también está implicado en otros procesos fisiológicos y patológicos de gran relevancia (80). En la polimerización de la actina, el retrómero desempeña un papel esencial mediante el reclutamiento del complejo WASH a la membrana de los endosomas a través de su unión con FAM21 (78). La actina participa en el reconocimiento de cargos, así como en la formación y transporte de la vesícula. Por tanto, el control de este proceso es fundamental para el tráfico y reciclaje de cargos. Este hecho se demuestra mediante la utilización de fármacos que promueven su despolimerización, resultando en la formación de vesículas elongadas que no son capaces de reconocer o transportar correctamente los cargos (140).

En este trabajo se ha caracterizado la asociación de FAM21 con el retrómero. Pese a que diferentes estudios habían sugerido la posibilidad de que FAM21 interacciona con VPS29, los datos obtenidos en esta tesis han permitido caracterizar por primera vez la unión de FAM21 con VPS29. Los resultados obtenidos muestran que la repetición R21 de FAM21, situada en su extremo C-terminal, interacciona a través de VPS29 de manera independiente del resto de subunidades del retrómero. Esta asociación involucra por un lado, a la leucina 1335 de FAM21 y por otro, al conjunto de residuos hidrofóbicos presentes en la superficie conservada de VPS29, los cuales están implicados en la interacción con RidL, TBC1D5 y VARP. Por tanto, estos resultados ponen de manifiesto que

FAM21-R21 utiliza un modo de unión con VPS29 similar al descrito para RidL, TBC1D5 y VARP. Además, dado que su afinidad por el retrómero es la más baja de todas las proteínas analizadas en este trabajo se puede pensar que FAM21 es desplazado de su unión a VPS29 por todas ellas. De hecho, dada la baja afinidad de FAM21 por el retrómero resulta imposible obtener el complejo estable en solución, impidiendo realizar los ensayos de competición *in vitro*.

A pesar de que la secuencia de los motivos repetidos de FAM21 es similar, la afinidad de las diferentes repeticiones por el retrómero es muy distinta. Estudios previos mostraron que las dos últimas repeticiones de FAM21, situadas en su extremo C-terminal, son las más importantes en la interacción con el retrómero, mientras que el resto de motivos están implicados de manera parcial en la unión (88). Por consiguiente, cada repetición contribuye de manera distinta en la interacción con el retrómero. De hecho, nuestros resultados sugieren que mientras que el motivo R21 se une a VPS29, el dominio R20 se une a través de la región central de VPS35. La polivalencia de FAM21 para interactuar a través de diferentes subunidades del retrómero y con distintas afinidades, podría jugar un importante papel a la hora de detectar y/o contribuir a la densidad de retrómero en la membrana de los endosomas, permitiéndole coordinar el reclutamiento del complejo WASH donde existe una concentración suficiente de retrómero. Sin embargo, se necesitan experimentos adicionales que permitan entender en mayor detalle la asociación del retrómero con FAM21 y la función de los diferentes motivos repetidos.

La actividad de FAM21 es esencial para promover el ensamblaje y la estabilidad del complejo WASH pero sobre todo para servir como puente conector con el retrómero y permitir su reclutamiento a la membrana de los endosomas. En estos orgánulos, el complejo WASH controla procesos clave para la correcta formación de las vesículas (77). La inhibición de su actividad da como resultado la alteración de múltiples procesos fisiológicos, los cuales han sido relacionados con diferentes patologías como neurodegeneración y cáncer (139, 140). Una de las enfermedades que más recurrentemente ha sido vinculada con la alteración de la actividad del complejo WASH es la enfermedad de Parkinson. Estudios

previos mostraron que la mutación puntual VPS35_{D620N}, conlleva una clara disminución de la presencia de los componentes del complejo WASH en la membrana de los endosomas (88, 139). Estos autores propusieron que la mutación VPS35_{D620N} perturba la unión de FAM21 con el retrómero y por consiguiente el reclutamiento del complejo WASH. Los datos obtenidos en nuestro trabajo muestran que esta región no está implicada en la asociación principal con FAM21, que se da mediante los motivos situados en su extremo C-terminal. Esto no impide que FAM21 pueda unirse a esta región de VPS35 a través de otros dominios que contribuyen de manera parcial a la interacción con el retrómero. Sin embargo, la afinidad de FAM21 por la forma nativa y mutante del retrómero es prácticamente idéntica, indicando que la presencia de la mutación puntual VPS35_{D620N} parece tener un menor efecto sobre el reclutamiento de FAM21 del que indican estos autores. Por último, nuestros datos también han permitido descartar que el mutante VPS35_{D620N} inhiba la formación del complejo entre VPS29 y VPS35, alterando el ensamblaje del retrómero. Por tanto, este trabajo ha permitido determinar que los defectos asociados a la mutación VPS35_{D620N} no están relacionados ni con la interacción de FAM21 con el retrómero ni con el ensamblaje de este complejo proteico en la membrana de los endosomas a través del retrómero. No obstante, para poder determinar las implicaciones de esta mutación que provocan la alteración del reclutamiento del complejo WASH a los endosomas, son necesarios datos adicionales.

La implicación del retrómero en la enfermedad de Alzheimer también ha sido ampliamente estudiada. En los últimos tiempos numerosos estudios genéticos y moleculares, así como diferentes trabajos realizados en modelos animales han puesto de manifiesto que la disfunción de la actividad del retrómero está íntimamente relacionada con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. En la enfermedad de Alzheimer los niveles de expresión de VPS26 y VPS35 disminuyen con la edad alterando el tráfico de los cargos dependientes del retrómero e implicados en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, BACE y APP. En modelos animales, se ha observado que la redistribución de estos cargos conlleva la acumulación del APP en los endosomas u otros lugares de

degradación amiloidogénica, provocando el aumento de la producción del péptido amiloide y consiguiente progresión de la enfermedad (83). Sin embargo, antes de la realización de esta tesis no existían evidencias claras de la interacción directa del retrómero con BACE y APP.

La selección de cargos por el retrómero implica el reconocimiento de motivos conservados presentes, principalmente, en la región citosólica de proteínas de membrana. Aunque los mecanismos moleculares que gobiernan esta unión continúan estando en debate existen evidencias estructurales que muestran que el reconocimiento de ciertos cargos está mediado de forma conjunta por el retrómero y sus proteínas SNXs asociadas (56). En este trabajo hemos conseguido definir la región de interacción de los cargos implicados en la enfermedad de Alzheimer BACE y APP con el retrómero. Esta es la primera vez que se demuestra de forma clara esta asociación. Los datos estructurales obtenidos permitieron localizar el sitio de unión en la interfase de VPS26 y SNX3. Esta región es la misma en la que se identificó la presencia de DMT1 (56) y confirman que estos tres cargos comparten un patrón de unión similar para asociarse con el retrómero. Sin embargo, aunque la interacción principal de BACE y APP con VPS26 implica la presencia de una leucina (L486 y L749) situada en la región central, su asociación con SNX3 se da a través de una arginina (R484 y R747). Estos resultados permiten definir un nuevo motivo conservado para el reconocimiento de cargos por el retrómero (R-X-L) similar al motivo canónico anteriormente descrito, $\emptyset X[L/M]$ (donde \emptyset es un aminoácido aromático y X cualquier aminoácido). Estas observaciones abren una vía para el estudio en profundidad del papel del retrómero en la progresión de enfermedades neurodegenerativas mediante el reciclaje de cargos.

En resumen, los datos bioquímicos, estructurales y celulares obtenidos a lo largo de este trabajo nos han permitido determinar que la superficie hidrofóbica de VPS29 es un importante sitio de unión a través del cual, numerosos factores endógenos y exógenos, se unen al retrómero para manipular su actividad. A pesar de la identificación de FAM21 como un nuevo ligando de VPS29, todavía quedan por determinar cuántas proteínas, ya sean endógenas o de patógenos, se

unen a esta misma superficie de VPS29. Así mismo, este estudio ha demostrado que la competición entre los diferentes ligandos, para ocupar la superficie conservada de VPS29, es uno de los principales mecanismos encargados de controlar temporal y espacialmente su reclutamiento a la membrana de los endosomas. Además, los datos obtenidos han puesto de manifiesto otro mecanismo de reclutamiento de efectores a través de proteínas que, como FAM21, interaccionan mediante diferentes motivos que contribuyen de manera distinta en la interacción. Finalmente, en este estudio se han presentado evidencias estructurales que permiten establecer las bases moleculares del reconocimiento de cargos relevantes en la enfermedad de Alzheimer por el retrómero.

Conclusiones

6. Conclusiones

- RidL₁₋₈₆₆ está formada por 47 α -hélices que adoptan una disposición espacial en forma de S, conectadas por “loops” de diferentes longitudes
- RidL interacciona con la superficie conservada de VPS29 a través de un “hairpin loop” situado entre los residuos 163 y 176
- El motivo de RidL prolina/isoleucina (P-I), ubicado en el extremo del “hairpin loop”, es clave en la interacción con VPS29
- RidL permite la formación de dímeros de retrómero
- RidL se localiza en la membrana de los endosomas a través de su interacción con el retrómero
- RidL compite con VARP y TBC1D5 por el mismo sitio de unión a VPS29
- La unión de FAM21 con el retrómero implica una interacción binaria a través de VPS29 y VPS35
- FAM21 interacciona con VPS29 a través de su extremo C-terminal (R21), mientras que el motivo R20 interacciona con VPS35
- La leucina 1335 juega un papel clave en la interacción de FAM21-R21 con VPS29
- La mutación VPS35 D620N, implicada en la enfermedad de Parkinson, no inhibe la asociación de FAM21-R2021 con el retrómero
- La unión de BACE y APP con el retrómero se da a través de la superficie situada entre VPS26 y SNX3
- BACE y APP comparten un patrón común de interacción con el retrómero en el que está implicado el motivo conservado RXL.

Bibliografía

7. Bibliografia

1. Vellai T, Vida G (1999) The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 266:1571–1577.
2. Bonifacino JS, Glick BS (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153–66.
3. Cohen S, Valm AM, Lippincott-Schwartz J (2018) Interacting organelles. *Curr Opin Cell Biol* 53:84-91.
4. Gu F, Crump CM, Thomas G (2001) Trans-Golgi network sorting. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1067–1084.
5. Glick, BS, Luni A (2011) Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:3-11.
6. Pavelka M, Neumüller J, Ellinger A (2008) Retrograde traffic in the biosynthetic secretory route. *Histochemistry and Cell Biology* 129:277–88.
7. Bonifacino JS, Rojas R (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 7:568–79.
8. Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *EMBO J* 30:3481–3500.
9. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J (2014) Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol.* 31:2–10.
10. Diekmann Y, Seixas E, Gouw M, Tavares-Cadete F, Seabra MC, Pereira-Leal JB (2011) Thousands of rab GTPases for the cell biologist. *PLoS Comput Biol* 7:e1002217.
11. Schekman R, Orci L (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271:1526-1533.
12. Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J (2003) Coat proteins: shaping membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 5:409-414.
13. Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL (2018) Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 87:871-896.

14. Scales SJ, Gomez M, Kreis TE (2000) Coat Proteins Regulating Membrane Traffic. *International Review of Cytology* 195:67–144.
15. Eugster A, Frigerio G, Dale M, Duden R (2000) COP I domains required for coatamer integrity and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J* 19:3905–3917.
16. Lippincott-Schwartz J, Liu W (2006) Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends in cell biology* 16:1–4.
17. Gürkan C, Stagg SM, Lapointe P, Balch WE (2006) The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 7:727–738.
18. Duden R (2003) ER-toGolgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol* 20:197-207.
19. Edeling MA, Smith C, Owen D (2006) Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 7:32–44.
20. Park SY, Guo X (2014) Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep* 4:29-34.
21. Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelmans L, Helenius A (2005) Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as a stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 170:769-779.
22. Hansen CG, Nichols BJ (2010) Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol* 20:177–186.
23. Seaman MN (2012) The retromer complex-endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci* 125:4693-4702.
24. Rappoport JZ, Kemal S, Benmerah A, Simon SM (2006) Dynamics of clathrin and adaptor proteins during endocytosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:1072-1081.
25. Miller SE, Collins BM, McCoy AJ, Robinson MS, Owen DJ (2007) A SNARE adaptor interaction is a new mode of cargo recognition in clathrin-coated vesicles. *Nature* 450:570–574.
26. Guo Y, Punj V, Sengupta D, Linstedt AD (2008) Coat-tether interaction in Golgi organization. *Molecular Biology of the Cell* 19:2830–2843.
27. Zink S, Wenzel D, Wurm CA, Schmitt HD (2009) A link between ER tethering and COP-I vesicle uncoating. *Dev. Cell* 17:403-416.
28. Kaksonen M, Roux A (2018) Mechanism of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 19:313-326.

29. McMahon HT, Boucrot E (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 12:517-533.
30. Stam S, Alberts J, Gardel ML, Munro E (2015) Isoforms confer characteristic force generation and mechanosensation by Myosin II filaments. *Biophys J* 108:1997-2006.
31. Simunovic M, Manneville JB, Renard HF, Evergren E, Raganathan K, Bhatia D, Voth GA, Prost J, McMahon HT, Johannes L, Bassereau P, Callan-Jones A (2017) Friction mediates scission of tubular membranes scaffolded by BAR proteins. *Cell* 170:172-184.
32. Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C (2017) The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 130:1347-1353.
33. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J (2014) Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev* 94:235-263.
34. Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467-480.
35. Caviston JP, Holzbaur EL (2006) Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends in Cell Biology* 16:530-537.
36. Seabra MC, Coudrier E (2004) Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* 5:393-399.
37. Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapere J, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* 279:580-585.
38. Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, Janssen H, Wubbolts R, Neefjes J (2001) The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* 11:1680-1685.
39. Sztul E, Lupashin V (2009) Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS Letters* 583:3770-83.
40. Grabski R, Hay J, Sztul E (2012) Tethering factor P115: A new model for tether-SNARE interactions. *BioArchitecture* 2:175-180.
41. Lepore DM, Martinez-Núñez L, Munson M (2018) Exposing the elusive exocyst structure. *Trends Biochem Sci* 18:30129-30140.
42. Martens S, McMahon HT (2008) Mechanisms of membrane fusion:

- disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 8:543-556.
43. Chernomordik LV, Kozlov MM (2003) Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* 72:175-207.
 44. Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 7:631-643.
 45. Fasshauer D (2003) Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1641:87-97.
 46. Jahn R, Lang T, Südhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
 47. D'Agostino M, Risselada HJ, Lürick A, Ungermann C, Mayer A (2017) A tethering complex drives the terminal stage of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature Letter* doi:10.1038.
 48. Chi RJ, Harrison MS, Burd CG (2015) Biogenesis of endosome-derived transport carriers. *Cell Mol Life Sci* 72:3551-3455.
 49. Hierro A, Gershlick DC, Rojas AL, Bonifacino JS (2015) Formation of tubulovesicular carriers from endosomes and their fusion to the trans-Golgi network. *Int Rev Cell Mol Biol* 318:159-202.
 50. Seaman MN, McCaffery JM, Emr SD (1998) A membrane cot complex essential for endosome to Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol* 142:665-681
 51. Nothwehr SF, Ha SA, Bruinsma P (2000) Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J Cell Biol* 151:297-310.
 52. Strohlic TI, Setty TG, Sitaram A, Burd CG (2007) Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J Cell Biol* 177:115-125.
 53. Verges M, Luton F, Gruber C, Tiemann F, Reinders LG, Huang L, Burlingame AL, Haft CR, Mostov KE (2004) The mammalian retromer regulates transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *Nat Cell Biol* 6:763-769.
 54. Chen C, Garcia-Santos D, Ishikawa Y, Seguin A, Li L, Fegan KH, Hildick-Smith GJ, Shah DI, Cooney JD, Chen W, Yien YY, Schultz IJ, Dalton AJ, Freedman ML, Palis J, Hattangadi SM, Lodish HF, Ward DM, Kaplan J, Maeda T, Ponka P, Paw BH (2013) Snx3 regulates recycling of the transferrin receptor and iron assimilation. *Cell Metab* 17:343-352.
 55. Eaton S (2008) Retromer retrieves wntless. *Dev Cell* 14:4-6.

56. Lucas M, Gershlick DC, Vidaurrazaga A, Rojas AL, Bonifacino JS, Hierro A (2016) Structural mechanism for cargo recognition by the retromer complex. *Cell* 167:1623-1635.
57. Bujny MV, Popoff V, Johannes L, Cullen PJ (2007) The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network. *J Cell Sci* 120:2010-2021.
58. Haft CR, de la Luz Sierra M, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA, Taylor SI (2000) Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29 and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol Biol Cell* 11:4105-4116.
59. Wassmer T, Attar N, Bujny MV, Oakley J, Traer CJ, Cullen PJ (2007) A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci* 120:45-54.
60. Hierro A, Rojas AL, Rojas R, Murthy N, Effantin G, Kajava AV, Steven AC, Bonifacino JS, Hurley JH (2007) Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449:1063-1067.
61. van Weering JR, Verkade P, Cullen PJ (2010) SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol* 21:371-380.
62. Teasdale RD, Collins BM (2012) Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structure, functions and roles in disease. *Biochem J* 441:39-59.
63. Gallop JL, McMahon HT (2005) BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem Soc Symp* 72:223-231.
64. Ghai R, Collins BM (2011) PX-FERM proteins: A link between endosomal trafficking and signaling?. *Small GTPases* 2:259-263.
65. Shi H, Rojas R, Bonifacino JS, Hurley JH (2006) The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 13:540-548.
66. Collins BM, Norwood SJ, Kerr MC, Mahony D, Seaman MN, Teasdale RD, Owen DJ (2008) Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic* 9:366-379.
67. Collins BM, Skinner CF, Watson PJ, Seaman MN, Owen DJ (2005) Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nat Struct Mol Biol* 12:594-602.

68. Wang D, Guo M, Liang Z, Fan J, Zhu Z, Zang J, Li X, Teng M, Niu L, Dong Y, Liu P (2005) Crystal structure of human vacuolar protein sorting protein 29 reveals a phosphodiesterase/nuclease-like fold and two protein-protein interaction sites. *J Biol Chem* 280:22962-22967.
69. Hesketh GG, Pérez-Dorado I, Jackson LP, Wartosch L, Schäfer IB, Gray SR, McCoy AJ, Zeldin OB, Garman EF, Evans PR, Seaman MN, Luzio JP, Owen DJ (2014) VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Dev Cell* 29:591-606.
70. Jia D, Zhang JS, Li F, Wang J, Deng Z, White MA, Osborne DG, Phillips-Krawczak C, Gómez TS, Li H, Singla A, Burstein E, Billadea DD, Rosen MK (2016) Structural and mechanistic insights into regulation of the retromer coat by TBC1d5. *Nat Commun* 7:13305.
71. Harrison MS, Hung CS, Liu TT, Christiano R, Walther TC, Burd CG (2014) A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc Nat Acad Sci USA* 111:267-272.
72. Rojas R, van Vlijmen T, Mardones GA, Prabhu Y, Rojas AL, Mohammed S, Heck AJ, Raposo G, van der Sluijs P, Bonifacino JS (2008) Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* 183:513-526.
73. Seaman MN, Harbour ME, Tattersall D, Read E, Bright N (2009) Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalyzed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci* 122:2371-2382.
74. Fukuda M (2016) Multiple roles of VARP in endosomal trafficking: Rabs, retromer components and R-SNARE VAMP7 meet on VARP. *Traffic* 17:709-719.
75. Gokool S, Tattersall D, Seaman MN (2007) EHD1 interacts with retromer to stabilize SNX1 tubules and facilitate endosome-to-Golgi retrieval. *Traffic* 8:1873-1886.
76. Puthenveedu MA, Lauffer B, Temkin P, Vistein R, Carlton P, Thorn K, Taunton J, Weiner OD, Parton RG, von Zastrow M (2010) Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell* 143:761-773.
77. Derivery E, Sousa C, Gautier JJ, Lombard B, Loew D, Gautreau A (2009) The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell* 17:712-723.
78. Harbour ME, Breusegem SY, Seaman MN (2012) Recruitment of the

- endosomal WASH complex is mediated by the extended “tail” of FAM21 binding to the retromer protein VPS35. *Biochem J* 442:209-220.
79. Jia D, Gomez TS, Billadeau DD, Rosen MK (2012) Multiple repeat elements within the FAM21 tail link WASH actin regulatory complex to the retromer. *Mol Biol Cell* 23:2352-2361.
 80. Abubakar YS, Zheng W, Olsson S, Zhou J (2017) Updated insight into the physiological and pathological roles of the retromer complex. *Int J Mol Sci* 18:E1601.
 81. Zhang H, Huang T, Hong Y, Yang W, Zhang X, Luo H, Xu H, Wang X (2018) The retromer complex and sorting nexins in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 10:79-81.
 82. Small SA, Kent K, Pierce A, Leung C, Kang MS, Okada H, Honig L, Vonsattel JP, Kim TW (2005) Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer’s disease. *Ann Neurol* 58:909-919.
 83. Chu J, Pratico D (2017) The retromer complex system in a transgenic mouse model of AD: Influence of age. *Neurobiol Aging* 52:32-38.
 84. Chung CY, Khurana V, Yi S, Sahni N, Loh KH, Auluck PK, Baru V, Udeshi ND, Freyzon Y, Carr SA (2017) In situ peroxidase labeling and mass-spectrometry connects Alpha-Synuclein directly to endocytic trafficking and mRNA metabolism in neurons. *Cell Syst* 4:242-250.
 85. Sowada N, Stiller B, Kubish C (2016) Increased copper toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* lacking VPS35, a component of retromer and monogenic Parkinson disease gene in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 476:528-533.
 86. Fujioka S, Ogaki K, Tacik PM, Uitti RJ, Ross OA, Wsolek ZK (2014) Update on novel familial forms of Parkinson’s disease and multiple system atrophy. *Park Relat Disord* 20:29-34.
 87. Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Hattori N (2012) VPS35 mutation in Japanese patients with typical Parkinson’s disease. *Mov Disord* 27:1413-1417.
 88. McGough IJ, Steinberg F, Jia D, Barbuti PA, McMillan KJ, Heesom KJ, Whone AL, Caldwell MA, Billadeau DD, Rosen MK, Cullen PJ (2014) Retromer binding to FAM21 and the WASH complex is perturbed by the Parkinson disease-linked VPS35(D620N) mutation. *Curr Biol* 24:1678.
 89. Mir R, Tonelli F, Lis P, Macartney T, Polinski NK, Martinez TN, Chou MY, Howden AJM, König T, Hotzy C, Milenkovic I, Brücke T, Zimprich A,

- Sammier E, Alessi DR (2018) The Parkinson's disease VPS35(D620N) mutation enhances LRRK2-mediated Rab protein phosphorylation in mouse and human. *Biochem J* 475:1861-1883.
90. Wang X, Zhao Y, Zhang X, Badie H, Zhou Y, Mu Y, Loo LS, Cai L, Thompson RC, Johnson PF, Wu C, Bu G, Mobley WC, Zhang D, Gage FH, Ranscht B, Xu H (2013) Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. *Nat Med* 19:473-480.
 91. Dhungel N, Eleuteri S, Li LB, Kramer NJ, Chartron JW, Spencer B, Fields JA, Stafa K, Adame A (2015) Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on alpha-synuclein. *Neuron* 85:76-87.
 92. Kingston D, Chang H, Ensser A, Lee HR, Lee J, Lee SH, Jung JU, Cho NH (2011) Inhibition of retromer activity by herpesvirus saimiri tip leads to CD4 downregulation and efficient T cell transformation. *J Virol* 85:10627-10638.
 93. Lipovsky A, Popa A, Pimienta G, Wyler M, Bhan A, Kuruvilla L, Guie MA, Poffenberger AC, Nelson CD, Atwood WJ, DiMaio D (2013) Genome-wide siRNA screen identifies the retromer as a cellular entry factor for human papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:7452-7457.
 94. Groppe E, Len AC, Granger LA, Jolly C (2014) Retromer regulates HIV-1 envelope glycoprotein trafficking and incorporation into virions. *PLoS Pathog* 10:e1004518.
 95. Takeda M, Pekosz A, Shuck K, Pinto LH, Lamb RA (2002) Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J virol* 76:1391-1399.
 96. Yin P, Hong Z, Yang X, Chung RT, Zhang L (2016) A role for retromer in hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 73:869-881.
 97. Bryan A, Youngster I, McAdams AJ (2015) Shiga toxin producing Escherichia coli. *Clin Lab Med* 35:247-272.
 98. Mirrashidi KM, Elwell CA, Verschueren E, Johnson JR, Frando A, Von Dollen J, Rosenberg O, Gulbahce N, Jang G, Johnson T, Jäger S, Gopalakrishnan AM, Sherry J, Dunn JD, Olive A, Penn B, Shales M, Cox JS, Starnbach MN, Derre I, Valdivia R, Krogan NJ, Engel J (2015) Global mapping of the Inc-Human interactome reveals that retromer restricts Chlamydia infection. *Cell Host Microbe* 18:109-121.
 99. Personnic N, Bärlocher K, Finsel I, Hilbi H (2016) Subversion of retrograde trafficking by translocated pathogen effectors. *Trends Microbiol* 24:450-462.

100. Hilbi H, Hoffman C, Harrison CF (2011) *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environ Microbiol Rep* 3:286-296.
101. Hoffman C, Harrison CF, Hilbi H (2014) The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell Microbiol* 16:15-26.
102. Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* 23:274-298.
103. Miyashita N, Higa F, Aoki Y, Kikuchi T, Seki M, Tateda K, Maki N, Uchino K, Ogasawara K, Kiyota H, Watanabe A (2017) Clinical presentation of *Legionella pneumophila*: Evaluation of clinical scoring systems and therapeutic efficacy. *J Infect Chemother* 23:727-732.
104. Herwaldt LA, Marra AR (2018) *Legionella*: a reemerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis* 31:325-333.
105. Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* 7:13-24.
106. Hubber A, Roy CR (2010) Modulation of the host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:261-283.
107. Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* 114:4337-4650.
108. Finsel I, Hilbi H (2015) Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: how to kill one bird with many stones. *Cell Microbiol* 17:935-950.
109. Shames SR, Liu L, Havey JC, Schofield WB, Goodman AL, Roy CR (2017) Multiple *Legionella pneumophila* effector virulence phenotypes revealed through high-throughput analysis of targeted mutant libraries. *Proc Nat Acad Sci U S A* 114:10446-10454.
110. Ensminger AW, Isberg RR (2009) *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Curr Opin Microbiol* 12:67-73.
111. Urwyler S, Nyfeler Y, Ragaz C, Lee H, Mueller LN, Aebersold R, Hilbi H (2009) Proteome analysis of *Legionella* vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic* 10:76-87.

112. Tan Y, Arnold RJ, Luo ZQ (2011) *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:21212-21217.
113. Ashida H, Kim M, Sasakawa C (2014) Exploitation of the host ubiquitin system by human bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 12:399-413.
114. Luo ZQ (2011) Striking a balance: modulation of host cell death pathways by *Legionella pneumophila*. *Front Microbiol* 2:36.
115. Hsu F, Zhu W, Brennan L, Tao L, Luo ZQ, Mao Y (2012) Structural basis for substrate recognition by a unique *Legionella* phosphoinositide phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13567-13572.
116. Price CT, Al-Quadan T, Santic M, Jones SC, Abu Kwaik Y (2010) Exploitation of conserved eukaryotic host cell farnesylation machinery by an F-box effector of *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* 207:1713-1726.
117. Zusman T, Aloni G, Halperin E, Kotzer H, Degtyar E, Feldman M, Segal G (2007) The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol Microbiol* 63:1508-1523.
118. Zhu W, Banga S, Tan Y, Zheng C, Stephenson R, Gately J, Luo ZQ (2011) Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One* 6:e17638.
119. Finsel I, Ragaz C, Hoffmann C, Harrison CF, Weber S, van Rahden VA, Johannes L, Hilbi H (2013) The *Legionella* effector RidL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14:38-50.
120. Wood WB (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol* 16:118-133.
121. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNA into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4645-4649.
122. Alsarraf HM, Laroche F, Spaink H, Thirup S, Blaise M (2011) Purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of TLDC domain of oxidation resistance protein 2 from zebrafish. *Acta Cryst Section F* 67:1253-1256.
123. Schägger H (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* 1:16-22.
124. Kabsch W (2010) XDS. *Acta Cryst D Biol Crystallogr* 66:125-132.

125. Rossman MG, Blow DM (1962) The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst* 15:24-31.
126. Sheldrick GM (2010) Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Cryst Section D* 67:355-367.
127. Kabsch W (2014) Processing of X-ray snapshots from crystals in random orientations. *Acta Cryst Section D* 70:2204-2216.
128. Murshudov GN (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Cryst Section D* 67:355-367.
129. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010) Features and development of Coot. *Acta Cryst Section D* 66:470-478.
130. McCoy AJ (2007) Phaser crystallographic software. *J of applied cryst* 40:658-674.
131. Vonrhein C, Blanc E, Roversi P, Bricogne G (2007) Automated structure solution with autoSHARP. *Methods in molecular biology* 364:215-230.
132. Cowtan K (2010) Recent developments in classical density modification. *Acta Cryst Section D* 67:355-367.
133. Martin SR, Schilstra MJ (2008) Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. *Methods Cell Biol* 84:263-293.
134. Velázquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, Freire E (2004) Isothermal titration calorimetry. *Curr Protoc Cell Biol* 17:27-31.
135. Franke D, Petoukhov MV, Konarev PV, Panjkovich A, Franklin JM, Jeffries CM, Svergun DI (2017) ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J appl Crystallogr* 50:1212-1225.
136. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605-1612.
137. Schneidman-Duhovny D, Hammel M, Tainer JA, Sali A (2016) FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles. *Nucleic Acids Res* 44:424-429.
138. McNally KE, Faulkner R, Steinberg F, Gallon M, Ghai R, Pim D, Langton P, Pearson N, Danson CM, Nägele H, Morris LL, Singla L, Heesom KJ, Sessions R, Banks L, Collins BM, Berger I, Billadeau DD, Burstein E, Cullen PJ (2017) Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal

cargo recycling. *Nat Cell Biol* 19:1214-1225.

139. Zavodszky E, Seaman MN, Moreau K, Jimenez-Snachez M, Breusegem SY, Harbour ME (2014) Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy. *Nat Commun* 5.
140. Gomez TS, Gorman JA, de Narvajas AA, Koenig AO, Billadeau DD (2012) Trafficking defects in WASH-knockout fibroblast originate from collapsed endosomal and lysosomal networks. *Mol Biol Cell* 23:3215-3228.

Publicaciones

- **Miguel Romano-Moreno**, Adriana L. Rojas, Chad D. Williamson, David C. Gershlick, María Lucas, Michail N. Isupov, Juan S. Bonifacino, Matthias P. Machner, Aitor Hierro (2017). Molecular mechanism for the subversion of the retromer coat by the Legionella effector RidL. *Proc Natl Acad Sci USA* 114(52), 11151-11160. DOI:10.1073/pnas.1715361115.
- De March M, Barrera-Vilarmau S, Crespan E, Mentegari E, Merino N, Gonzalez-Magaña A, **Romano-Moreno M**, Maga G, Crehuet R, Onesti S, Blanco FJ, De Biasio A (2018). P15PAF binding to PCNA modulates the DNA sliding surface. *Nucleic Acids Res* 46(18), 9816-9828. DOI: 10.1093/nar/gky723.
- Amaia Gonzalez-Magaña, Alain Ibáñez de Opakua, **Miguel Romano-Moreno**, Javier Murciano-Calles, Nekane Merino, Irene Luque, Adriana Rojas, Silvia Onesti, Francisco Blanco, and Alfredo De Biasio (2018). Molecular recognition of the p12 subunit of human polymerase δ by PCNA through an atypical PIP-box. *Submitted*.



Molecular mechanism for the subversion of the retromer coat by the *Legionella* effector RidL

Miguel Romano-Moreno^a, Adriana L. Rojas^a, Chad D. Williamson^b, David C. Gershlick^b, María Lucas^a, Michail N. Isupov^c, Juan S. Bonifacino^b, Matthias P. Machner^{d,1}, and Aitor Hierro^{a,e,1}

^aStructural Biology Unit, Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias, 48160 Derio, Spain; ^bCell Biology and Neurobiology Branch, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; ^cThe Henry Wellcome Building for Biocatalysis, Biosciences, University of Exeter, Exeter EX4 4SB, United Kingdom; ^dDivision of Molecular and Cellular Biology, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; and ^eIKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbao, Spain

Edited by Ralph R. Isberg, Howard Hughes Medical Institute and Tufts University School of Medicine, Boston, MA, and approved November 13, 2017 (received for review August 30, 2017)

Microbial pathogens employ sophisticated virulence strategies to cause infections in humans. The intracellular pathogen *Legionella pneumophila* encodes RidL to hijack the host scaffold protein VPS29, a component of retromer and retriever complexes critical for endosomal cargo recycling. Here, we determined the crystal structure of *L. pneumophila* RidL in complex with the human VPS29–VPS35 retromer subcomplex. A hairpin loop protruding from RidL inserts into a conserved pocket on VPS29 that is also used by cellular ligands, such as Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member 5 (TBC1D5) and VPS9-ankyrin repeat protein for VPS29 binding. Consistent with the idea of molecular mimicry in protein interactions, RidL outcompeted TBC1D5 for binding to VPS29. Furthermore, the interaction of RidL with retromer did not interfere with retromer dimerization but was essential for association of RidL with retromer-coated vacuolar and tubular endosomes. Our work thus provides structural and mechanistic evidence into how RidL is targeted to endosomal membranes.

pathogenic bacteria | membrane targeting | coat complex | *Legionella* effector | X-ray crystallography

Endosomal trafficking is a dynamic process by which cells modulate a wide array of physiological functions, including nutrient uptake, cellular polarization, cytokinesis, neural signaling, development, and the innate immune response (1, 2). Sorting of integral membrane proteins and associated macromolecules, termed “cargos,” from endosomes requires complex molecular machineries that, through multiple protein–lipid and protein–protein interactions, bind to cargo and deform the membrane into a coated bud (3–5). Retromer is a coat complex that assembles on endosomes and forms tubular carriers for the delivery of recycled material to the plasma membrane, the *trans*-Golgi network, or other specialized organelles (6, 7). The retromer complex comprises a conserved VPS26–VPS29–VPS35 heterotrimer (with two VPS26 variants, VPS26A and VPS26B) that, in combination with various sorting nexin (SNX) proteins, is recruited to endosomal membranes to select cargo (8–10). The SNX family is a diverse group of proteins characterized by the presence of a phox homology domain that binds primarily to phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) to target the proteins to the membrane (5, 11). Of the 33 SNXs described in mammals, 7 have been identified as putative retromer interactors: SNX1, SNX2, SNX5, SNX6, SNX27, SNX3, and SNX12. Retromer does not have intrinsic membrane-binding activity and thus relies on its association with SNXs, transmembrane cargo proteins, and the small GTPase Rab7 for recruitment to endosomes (12–15). Although the affinity of retromer for Rab7 is weak, simultaneous interactions with SNXs and cargo combined with retromer oligomerization most likely provide an avidity effect for a strong yet reversible interaction.

Other accessory proteins that directly interact with retromer and regulate endosomal trafficking include the FAM21 subunit of the WASH actin nucleation complex (16), the adaptor VPS9-ankyrin repeat protein (VARP) (17) that binds to the R-SNARE

VAMP7 together with several Rab GTPases that function along distinct trafficking pathways (18), and the Tre-2/Bub2/Cdc16 domain family member 5 (TBC1D5), a GTPase-activating protein (GAP) that causes Rab7 inactivation and redistribution to the cytosol (14).

Recent biochemical and structural characterization of single subunits and subcomplexes from retromer have provided insights into its modular architecture and mechanisms of action. VPS35 adopts an elongated α -helical solenoid structure with some bending capability around the midsection, and functions as a platform on which VPS26 and VPS29 bind independently at opposite ends (19, 20). VPS26 adopts an arrestin-like fold (21, 22), interacts with the VPS35 N-terminal side, and—in complex with SNX3—functions as a cargo adaptor for the canonical recycling motif \emptyset X(L/M) (where \emptyset is an aromatic amino acid) that mediates retromer-dependent sorting (20). In addition, association of Rab7 with the VPS35 N-terminal side enhances the interaction with cargo (15). VPS26 also interacts with the SNX27 PDZ domain for recruiting cargo proteins containing a type I PDZ domain-binding motif (23, 24). VPS29 has a metallophosphoesterase fold with two conserved surface patches at opposite sides (25, 26).

Significance

Deciphering microbial virulence mechanisms is of fundamental importance for the treatment of infectious diseases. *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaires' pneumonia, hijacks a variety of host cell factors during intracellular growth. Herein, we uncovered the molecular mechanism by which the *L. pneumophila* effector RidL targets the host VPS29, a scaffolding protein of endosome-associated sorting machineries. Using X-ray crystallography, we determined the structure of RidL, both alone and in complex with retromer. We found that RidL uses a hairpin loop similar to that present in cellular ligands to interact with retromer. This sophisticated molecular mimicry allows RidL to outcompete cellular ligands for retromer binding, explaining how *L. pneumophila* utilizes the endosomal sorting machinery to facilitate targeting of effector proteins.

Author contributions: J.S.B., M.P.M., and A.H. designed research; M.R.-M., A.L.R., C.D.W., D.C.G., M.L., M.N.I., and A.H. performed research; M.R.-M., A.L.R., C.D.W., D.C.G., M.L., M.N.I., J.S.B., M.P.M., and A.H. analyzed data; and M.R.-M., A.L.R., C.D.W., D.C.G., M.L., J.S.B., M.P.M., and A.H. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

This open access article is distributed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 \(CC BY-NC-ND\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Data deposition: The atomic coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.wwpdb.org (PDB ID codes 5OT4, 5OSH, and 5OSI).

¹To whom correspondence may be addressed. Email: machnerm@mail.nih.gov or ahierro@cicbiogune.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1715361115/-DCSupplemental.

The VPS35 C-terminal side interacts with the patch around the incomplete catalytic site of VPS29 and occludes it (19), whereas the opposite conserved patch interacts with two cysteine-rich zinc-binding motifs of VARP (17), and an extended loop (Ins1) from the TBC GAP domain of TBC1D5 (TBC1D5_{TBC}) (27). Thus, the VPS26 side of retromer contributes both directly and indirectly to cargo recognition and membrane docking in combination with different SNXs, whereas the VPS29 side functions as scaffold for dimerization and association with distinct accessory proteins that regulate retromer activity.

The exploitation of recycling endosomal transport by viral and bacterial pathogens is an emerging strategy used to evade degradation and to promote replication during infection (28). Given their biological importance and high level of conservation, it is not surprising that retromer and retromer-associated proteins are opportune targets of a variety of microbial proteins. Some examples include the envelope glycoprotein of the HIV type-1 that binds directly to retromer for endosome-to-Golgi transport (29), the capsid protein L2 of the human papillomavirus type 16 that binds to the PDZ domain of SNX27 for virion trafficking to the nucleus (30, 31), the tyrosine kinase-interacting (Tip) protein of the herpesvirus saimiri that interacts with the retromer subunit VPS35 to impair cation-independent mannose 6-phosphate receptor (CI-MPR) trafficking and down-regulate CD4 surface expression (32), and the effector IncE of *Chlamydia trachomatis* that binds to SNX5/6 and disrupts CI-MPR trafficking (33–35).

Another bacterium that hijacks host cell retromer function is *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaires' pneumonia. Upon phagocytosis by host cells, such as freshwater amoeba in the environment or alveolar macrophages during infection, the intravacuolar pathogen dictates the fate of the membrane compartment in which it resides (36). It inhibits fusion of the *Legionella*-containing vacuole (LCV) with endosomes and lysosomes (37), and instead promotes interaction with host vesicles from the early secretory pathway and other yet to be identified membrane compartments (38–40). In doing so, *L. pneumophila* creates a camouflaged intracellular replicative niche that supports its survival and replication (36). During infection, *L. pneumophila* delivers close to 300 proteins, called effectors, into the host cytosol via a specialized translocation apparatus termed the Dot/Icm type IV secretion system (T4SS) (41). The combined activity of these effectors subverts host processes and signaling pathways, including gene expression, metabolism, and vesicle trafficking to promote intracellular proliferation of *L. pneumophila* (42). Despite extensive efforts, most *L. pneumophila* effectors have not been characterized in detail and their mode of action has remained unknown.

RidL (Lpg2311/Ceg28) is a 1,167-amino acid protein that, like most *L. pneumophila* effectors, lacks sequence homology to known proteins (43). Recent studies revealed that RidL interacts with the VPS29 subunit of retromer, localizes to LCVs, and promotes intracellular replication of *L. pneumophila* within amoeba and macrophages (44). Considering that depletion of retromer components increases *L. pneumophila* growth, and ectopically produced RidL reduces retrograde trafficking, it was proposed that RidL might restrict retromer function (44). Nonetheless, despite the significance of the RidL–retromer interaction in bacterial infection, the molecular details and mechanistic implications remain unknown. In this work, we performed a comprehensive analysis of the RidL–retromer complex at a structural, molecular, and cellular level and discovered a remarkable mode of molecular mimicry used by RidL for specific subcellular membrane targeting through VPS29 interaction.

Results

The N-Terminal Region of RidL Mediates the Interaction with Retromer.

The primary structure of RidL has no significant homology to other proteins that could facilitate the identification of functional

domains. Thus, we performed experiments to identify the regions in RidL that are important for binding to retromer. Guided by secondary structure predictions, we created truncated forms of *ridL*, purified the corresponding proteins from *Escherichia coli*, and tested their ability to interact with retromer in pull-down assays. We found that only those fragments containing the N-terminal region spanning amino acids 30–236 interacted with a stable retromer subcomplex (VPS29–VPS35C) composed of VPS29 and the C-terminal region of VPS35 (amino acids 476–780) (Fig. 1 *A* and *B*). Fragments comprising the central (RidL_{167–866}) or C-terminal region (RidL_{866–1167}) of RidL, or GST alone (control), did not bind VPS29–VPS35C (Fig. 1*B*). Similar observations were made by size-exclusion chromatography (SEC), where full-length RidL or RidL_{1–236} coeluted with retromer, the VPS29–VPS35C subcomplex, or monomeric VPS29, while the peak containing RidL_{167–866} migrated separate from the peak of the VPS29–VPS35C subcomplex (Fig. S1). Since neither RidL_{167–866} nor RidL_{866–1167} showed any noticeable reduction in stability or solubility compared with RidL, it is unlikely that failure to bind VPS29 was due to their misfolding. Taken together, these analyses demonstrated that RidL_{1–236} was the smallest fragment tested here that stably interacted with VPS29.

Next, we compared the binding affinity (K_d) of RidL with that of an N-terminal fragment (amino acids 30–236) of RidL (RidL_{30–236}) for retromer (VPS26–VPS29–VPS35) by isothermal titration calorimetry (ITC). We chose to use RidL_{30–236} over RidL_{1–236} for the ITC analysis because of better purification yields. The affinities of RidL ($K_d = 151$ nM) and RidL_{30–236} ($K_d = 164$ nM) for retromer were similar, indicating that retromer binding was mediated mainly by the N-terminal region of RidL, and that no other region of RidL made a major contribution to complex formation (Fig. 1*C*). Furthermore, the affinities of RidL for either retromer, the VPS29–VPS35C subcomplex, or the monomeric VPS29 subunit were almost identical (K_d retromer = 151 nM; K_d VPS29–VPS35C = 151 nM; K_d VPS29 = 181 nM) (Fig. 1*D*), suggesting that binding of RidL to retromer occurred mainly, if not exclusively, through VPS29 independent of other retromer subunits. These results are fully consistent with the previously reported coimmunoprecipitation assays describing the VPS29–RidL interaction (44), and further extend the precise mapping of RidL_{30–236} as the region responsible for contacting the VPS29 subunit of retromer.

Structure of RidL_{1–866}. To further investigate the molecular basis for the binding of RidL to retromer, we initiated the structural characterization of the complex by X-ray crystallography. Initial attempts using either retromer, the VPS29–VPS35C subcomplex or the VPS29 subunit bound to different RidL constructs, yielded either no crystals or crystals with poor diffraction quality. The best crystals, obtained with the VPS29–VPS35C subcomplex and RidL_{1–236}, diffracted to 4.3 Å. At this stage, molecular replacement using the structure of the VPS29–VPS35C subcomplex (PDB ID code 2R17) provided a clear solution with four VPS35C–VPS29 molecules per asymmetric unit showing partial-difference electron density for RidL_{1–236}. However, the lack of high-resolution data precluded the iterative refinement and model-building steps necessary to extract structural information for RidL_{1–236}. Thus, we focused on obtaining a higher-resolution structure of uncomplexed RidL. The construct of RidL-encompassing amino acids 1–866 (RidL_{1–866}) produced well-diffracting crystals. The structure was solved by single-wavelength anomalous diffraction using selenium as the anomalous scatterer and refined to 3.0-Å resolution (Fig. 2*A*, Fig. S2*A* and *B*, and Table S1).

The structure of RidL_{1–866} corresponds to an all- α protein formed by 47 α -helices (Fig. 2*A* and *B*). The overall structure adopts an S-shape with a length of 120 Å and a width of 50 Å at the top and 85 Å at the base (Fig. 2*A*). RidL_{1–866} showed no obvious structural similarity to any known entry in the protein

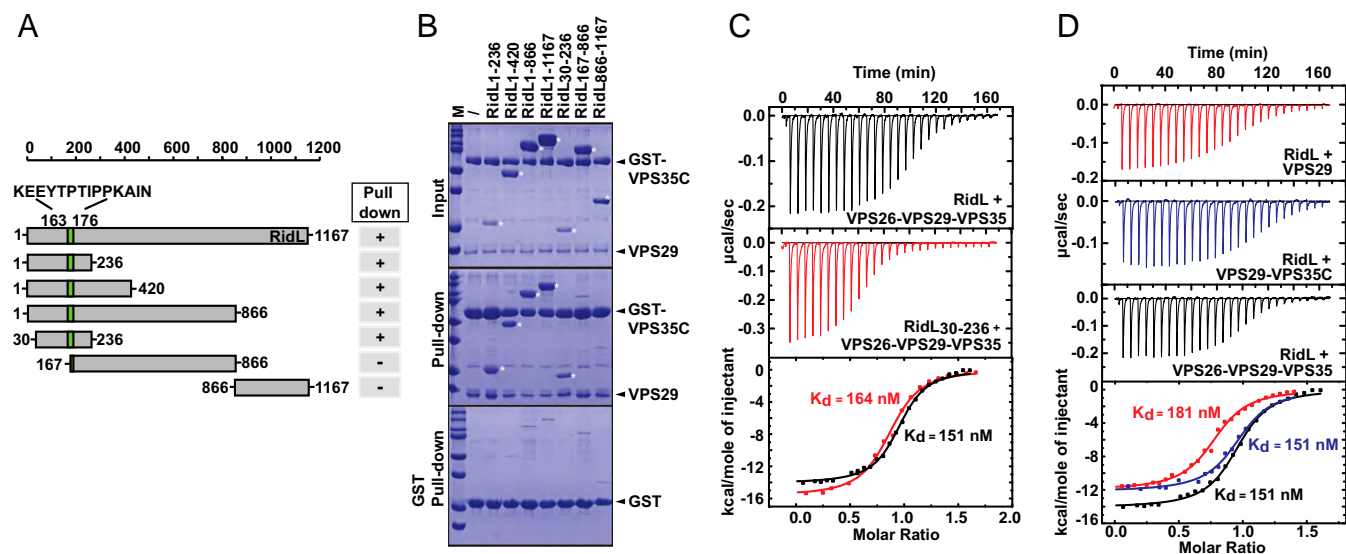


Fig. 1. The N-terminal region of RidL binds retromer through VPS29. (A) Schematic representation of the different constructs of RidL used in this work. The loop region of RidL involved in binding to retromer is colored in green. The plus (+) and minus (–) show whether the indicated constructs did or did not bind to VPS29–VPS35C. (B) Pull-down of RidL variants by VPS29-[GST-VPS35C] resolved by SDS/PAGE and visualized by Coomassie blue staining. The *Top* shows the protein input, while the *Middle* proteins bound to glutathione-Sepharose beads after incubation of VPS29-[GST-VPS35C] with each of the indicated RidL constructs. The *Bottom* shows a parallel pull-down using GST as bait that served as a negative control. Controls with GST-tag alone exhibit minimal nonspecific binding. M, molecular mass marker (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, and 20 kDa). The position of the respective proteins is indicated on the right. Bands corresponding to RidL constructs are marked with white asterisks (*). (C) ITC thermograms for the titration of RidL (black) or RidL₃₀₋₂₃₆ (red) with retromer. (D) ITC thermograms for the titration of RidL with VPS29 (red), VPS29–VPS35C (blue), and retromer (black). Thermodynamic binding parameters for ITC measurements in C and D are reported in Fig. S5C.

data bank [Dali server analysis (45)]. An alternative subdomain analysis also revealed no significant resemblance to other known domains except for the terminal three-helix bundle (amino acids

712–863) for which the sequence identity with the top matches was very low (less than 13%), thus limiting the prediction of potential functions for RidL (Fig. 2 B and C).

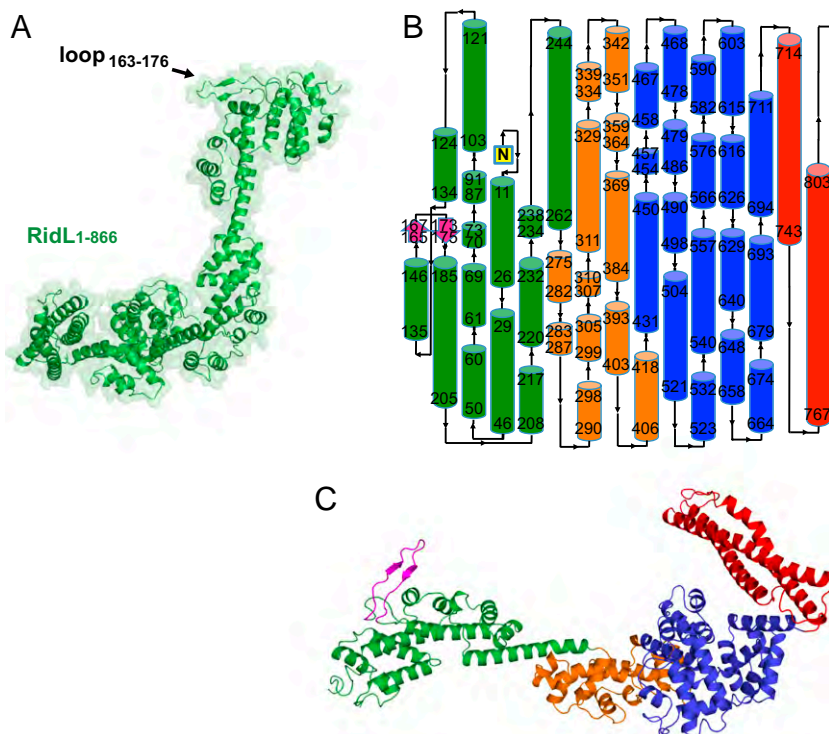


Fig. 2. Structure of RidL₁₋₈₆₆. (A) Overall structure of RidL₁₋₈₆₆ (green) represented by a ribbon diagram with transparent surface. The loop segment (residues 163–176) through which binding to VPS29 occurs is marked with an arrow. Topology diagram of RidL₁₋₈₆₆ (B) and ribbon diagram (C) colored on the basis of the different predicted domains: green (residues 6–262), orange (residues 263–429), blue (residues 430–711), red (residues 712–863), and magenta (residues 163–176).

Crystal Structure of RidL₁₋₂₃₆ Bound to the VPS29–VPS35C Subcomplex. With the 3.0-Å resolution structure of RidL₁₋₈₆₆ (Fig. 2) on hand, we used its RidL₁₋₂₃₆ part and the VPS35C–VPS29 structure (PDB ID code 2R17) as models for the molecular-replacement solution of the aforementioned 4.3-Å hetero-trimeric RidL₁₋₂₃₆–VPS29–VPS35C complex. The final structure has a free *R*-factor of 29.4 and good stereochemistry (Fig. S2 C and D and Table S1). The crystals contain four copies of each RidL₁₋₂₃₆ and VPS29–VPS35C in the asymmetric unit. Each RidL₁₋₂₃₆ molecule establishes contacts with two copies of VPS35C at different sites and a single contact with VPS29. The RidL₁₋₂₃₆–VPS29–VPS35C interaction occurs via a protruding hairpin loop of RidL (amino acids 163–176) that binds to a hydrophobic pocket on the surface of VPS29 opposite to the VPS29–VPS35C interface (Fig. 3A). Notably, no other region of RidL₁₋₂₃₆ establishes a direct contact with VPS29, suggesting that the interaction solely relies on the hairpin loop. Based on this observation, we crystallized a peptide comprising the entire hairpin loop (RidL_{loop}, residues 163–176) with VPS29–VPS35C, and determined the structure of the complex at 2.5-Å resolution (Fig. 3B and Table S1). The difference Fourier map shows clear electron density for the RidL peptide, with most side chains being well defined (Fig. S2 E and F). Overall, recognition of the hydrophobic pocket of VPS29 by RidL_{loop} covers a surface area of 420 Å² and is dominated by hydrophobic interactions (Fig. 3 C and D). The side chains P168, I170, and P172 at the edge of the hairpin loop of RidL are the most-buried residues upon complex formation and are at the center of the interface. P168 interacts with a shallow hydro-

phobic pocket formed by L25, V172, and V174 of VPS29. The carbonyl group of the main chain of T169 establishes a hydrogen bond with Y165 of VPS29. The side chain of I170 inserts deep into a cavity formed by L2, L25, L26, K30, I31, L152, and Y165 of VPS29. The next residue in the hairpin loop, P171 further contributes to the burial of I170, making hydrophobic contacts with L2 and L152 of VPS29, while also helping to position the following P172 in a ring–ring stacking interaction with Y163 of VPS29. In addition, the interaction is reinforced with a hydrogen bond between Y166 of RidL and R176 of VPS29. More peripherally, Y166 of RidL is buried between the crossing segment of the hairpin loop and a shallow hydrophobic pocket formed by Y163, V174, and R176 of VPS29, thus providing an extended flat contact that further stabilizes the hairpin conformation. Importantly, a comparison between the primary sequences of VPS29 from human (the disease host) and other metazoa, including amoebae (the environmental host), showed that all VPS29 residues at the contact site are highly conserved (Fig. 3E and Fig. S3), suggesting that the interaction between RidL and VPS29 has the same binding mode in all hosts.

Overall Assembly of the RidL–Retromer Complex in Solution. The structure of RidL₁₋₂₃₆ bound to the VPS29–VPS35C subcomplex presented here (Fig. 3) revealed two elongated macromolecules connected via a single-point junction. Interestingly, upon comparison of the structures of RidL₁₋₈₆₆ alone and RidL₁₋₂₃₆ bound to VPS29–VPS35C, it became clear that the orientation of the RidL hairpin loop involved in the interaction with VPS29 remained essentially unaltered, despite the different crystallization conditions and crystal packing interactions. To capture the global shape of the RidL–retromer complex, we performed small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments and ab initio reconstructions. We obtained representative bead models with low average spatial discrepancy from two samples, RidL₁₋₈₆₆–VPS29–VPS35C and RidL₁₋₄₂₀–retromer (Fig. 4 A and B and Fig. S4 A–D). While the bead-model shape of RidL₁₋₈₆₆–VPS29–VPS35C was elongated and twisted with two protruding edges, the bead-model of RidL₁₋₄₂₀–retromer exhibited an elbow-shaped rod. Rigid-body refinement on the bead models using the crystal structures of RidL₁₋₈₆₆ (present study) and VPS29–VPS35C (19) (Fig. 4A), or RidL₁₋₄₂₀–VPS29–VPS35C (present study) and VPS29–VPS35C (20) (Fig. 4B) resulted in a very good fit between the theoretical scattering profiles for each macromolecular model and the experimental SAXS data (Fig. 4 A and B and Fig. S4 A and B). Superposition of both models yielded a complete RidL₁₋₈₆₆–retromer ensemble with a distinctive V-architecture (Fig. 4C). However, attempts to obtain a bead-model with RidL₁₋₈₆₆–retromer failed to converge on a single best-fit conformation, which might be indicative of a multiconformational equilibrium. In this scenario, the composite RidL₁₋₈₆₆–retromer ensemble would represent a conformational snapshot between fluctuating states.

Previous studies have demonstrated that retromer can form dimers through the VPS29 side ends at high protein concentration and physiological ionic strength (20, 46). Although the molecular details for the dimerization remain unknown, it has been speculated that the self-dimerization propensity could contribute to retromer coat assembly (20). Given that RidL interacted with retromer through the VPS29 subunit, we wondered whether RidL affects retromer dimerization. Using SEC with in-line multiangle light scattering (SEC-MALS), we characterized the molecular mass for each complex. Interestingly, RidL behaved as a monomer under physiological ionic strength, but when incubated with retromer, the complex exhibited a molar mass consistent with a 2:2 oligomer, thus allowing the formation of retromer dimers. In contrast, when RidL was incubated with monomeric retromer in a high ionic strength buffer, the molar mass was consistent with a 1:1 complex (Fig. S4 E–G).

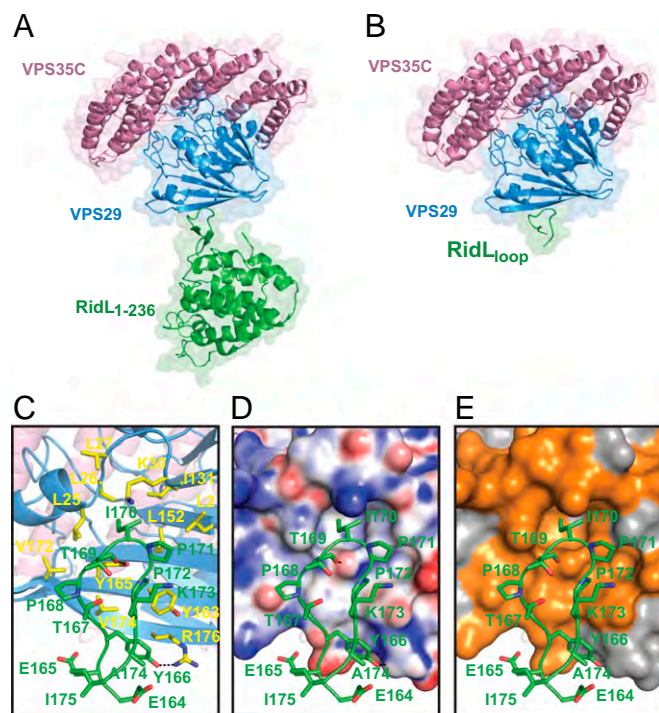


Fig. 3. Structures of RidL in complex with retromer. (A) Overall structure of the complex formed by RidL₁₋₂₃₆ and VPS29–VPS35C with transparent surfaces. RidL₁₋₂₃₆ is colored in green, VPS29 in blue, and VPS35C in pink. (B) Overall structure of VPS29–VPS35C in complex with the hairpin loop of RidL (residues 163–176) with transparent surface map. The structure is colored as in A. (C) VPS29–RidL_{loop} interaction in detail. Critical VPS29 and RidL residues are shown as sticks. Hydrogen bonds formed between the RidL hairpin loop and VPS29 are denoted by black dashed lines. (D) Electrostatic surface potential (–25 to +25 kT/e in red to blue) mapped on the surface of VPS29 structure, in the same orientation as in C. (E) Strictly conserved residues shown in Fig. S3 are mapped onto the surface of VPS29.

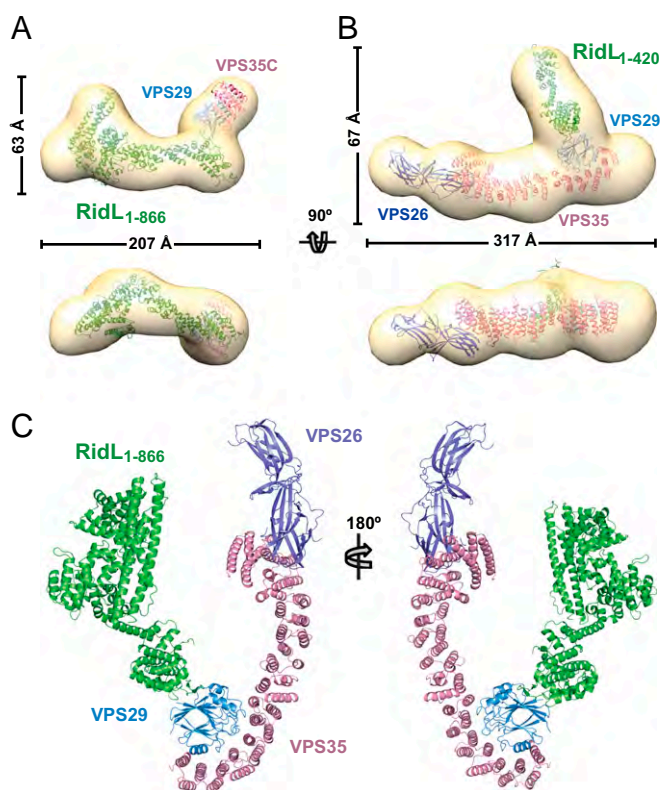


Fig. 4. Overall assembly of the RidL–retromer complex in solution. (A and B) Ab initio molecular envelopes generated from the SAXS scattering data of the RidL_{1–866}–VPS29–VPS35C complex (A) and RidL_{1–420}–retromer complex (B). The crystal structures of the individual domains are docked into the envelopes. (C) Proposed model of the RidL_{1–866}–retromer complex obtained from the superposition of RidL_{1–866}–VPS29–VPS35C and RidL_{1–420}–retromer complexes.

Therefore, the interaction of retromer with RidL did not preclude its dimerization in solution.

Mutations in the VPS29–RidL Interface Disrupt Complex Formation.

To confirm that the binding mode between RidL_{1–236} and VPS29–VPS35C observed in the crystal structure (Fig. 3) was responsible for complex formation in solution (Fig. 1), we introduced single-point mutations on contact site residues between VPS29 and RidL, and assessed their effect on protein interaction by pull-down as well as ITC measurements. We introduced the mutations L152E, Y163A, or Y165A within the central region of the VPS29 interface since those residues seemed especially important for binding to RidL. On the reciprocal side, we either replaced the central region of the hairpin loop (amino acids 166–173) of RidL, which protrudes into the conserved pocket of VPS29, by a single glycine linker (RidL_{ΔL}), or introduced two single-point mutations Y166A and I170A. The overall secondary structure of these mutant proteins was not noticeably affected by the substitutions, as reflected by the fact that the circular dichroism spectra of the wild-type and mutant forms of RidL or VPS29 remained unchanged (Fig. S5 A and B). In agreement with the structural data, substitution of any of the interface residues strongly attenuated the interaction between VPS29 and RidL, as assessed by pull-down assays using GST-tagged RidL as bait (Fig. 5A). To corroborate these results, we determined the binding affinities of VPS29_{L152E}, VPS29_{Y163A}, VPS29_{Y165A}, RidL_{ΔL}, RidL_{Y166A}, and RidL_{I170A} using ITC (Fig. 5B and Fig. S5C). As expected, mutation of any of the interface residues (L152E, Y163A, Y165A in VPS29; Y166A, I170A in RidL), or

truncation of the loop in RidL (RidL_{ΔL}) resulted in a complete loss of binding, underscoring the critical importance of the hydrophobic and hydrogen bond interactions for the formation of a stable VPS29–RidL complex. We also evaluated the interaction between the synthetic RidL_{loop} peptide (residues 163–176) and VPS29 but detected no binding by ITC, most likely because the peptide does not form the hairpin structure in solution that is critical for the recognition process. Finally, we tested the interaction between full-length RidL and the retromer complex containing either VPS29, VPS29_{Y163A}, or VPS29_{Y165A} (Fig. 5C and Fig. S5C). Unlike wild-type retromer, retromer containing VPS29_{Y163A} or VPS29_{Y165A} failed to interact with RidL, further confirming that the crystal contacts observed between RidL_{1–236} and VPS29–VPS35C are indeed relevant for complex formation between RidL and retromer.

RidL Localizes to Endosomal Membranes Occupied by Retromer.

To assess if the interactions between RidL and retromer observed in vitro (Figs. 3 and 5) are also relevant in cells, we used fluorescence microscopy to examine the distribution of GFP–RidL–encoding constructs expressed by transient transfection in HeLa cells. Live-cell imaging of the transfected cells showed that the signal for full-length GFP–RidL was barely detectable. In contrast, a GFP-tagged, N-terminal RidL fragment comprising amino acids 1–236 (GFP–RidL_{1–236}) was produced at high levels and displayed a punctate cytoplasmic localization (Fig. 6A). Additional studies in fixed HeLa cells revealed that the cytoplasmic puncta containing GFP–RidL_{1–236} colocalized with the endogenous VPS26 subunit of retromer (Fig. 6B and C). Simultaneous production of either GFP- or mCherry-tagged RidL_{1–236} with differently tagged forms of other organellar markers in live cells showed colocalization of RidL_{1–236} with the VPS29 subunit of retromer (Fig. 6D and E) and the endosomal proteins early endosome antigen 1 (EEA1), Rab5, and SNX12, but not the *trans*-Golgi network protein TGN38 (Fig. 6D and E and Fig. S6A). Continuous live-cell imaging further revealed that mCherry–RidL_{1–236} colocalized with YFP–VPS29 on vacuolar endosomes as well as dynamic tubules emanating from those endosomes (Fig. 6D, *Inset*, and *Movie S1*). EEA1–GFP also exhibited significant colocalization with mCherry–RidL_{1–236} on the vacuolar part of endosomes but, unlike YFP–VPS29, it was not associated with the budding tubules (Fig. 6D, *Inset*, and *Movie S2*). Together, these studies demonstrated that exogenously produced RidL_{1–236} specifically localized to vacuolar and tubular endosomes, and that the presence of RidL did not affect retromer localization to those membranous structures.

RidL Localization to Endosomes Requires VPS29 Binding.

Our in vitro studies revealed that removal of the central region of the hairpin loop (amino acids 166–173) from RidL (RidL_{ΔL}) abolished binding to either monomeric VPS29 or VPS29 as part of the retromer complex (Fig. 5). Hence, we tested if the hairpin loop played an equally important role for endosomal localization of RidL. Upon deletion of the hairpin loop in the context of GFP–RidL_{1–236}, the resulting GFP-tagged mutant protein (GFP–RidL_{1–236, ΔL}) assumed a diffuse cytosolic distribution within cells, with no detectable enrichment on endosomal compartments (Fig. 6A–C and E and Fig. S6B and C). Failure to target to endosomes indicated that binding of RidL to retromer, in particular to VPS29, is essential for its proper localization within cells. To further test this hypothesis, we silenced retromer by RNA interference (RNAi), and analyzed its effect on RidL distribution. In contrast to mock RNAi-treated control cells, knockdown of the VPS35 subunit of retromer prevented association of GFP–RidL_{1–236}, but not EEA1, with endosomes (Fig. S7). Taken together, these experiments demonstrated that the interaction of the hairpin loop of RidL with retromer, revealed by our crystallographic and biochemical analyses, is essential for

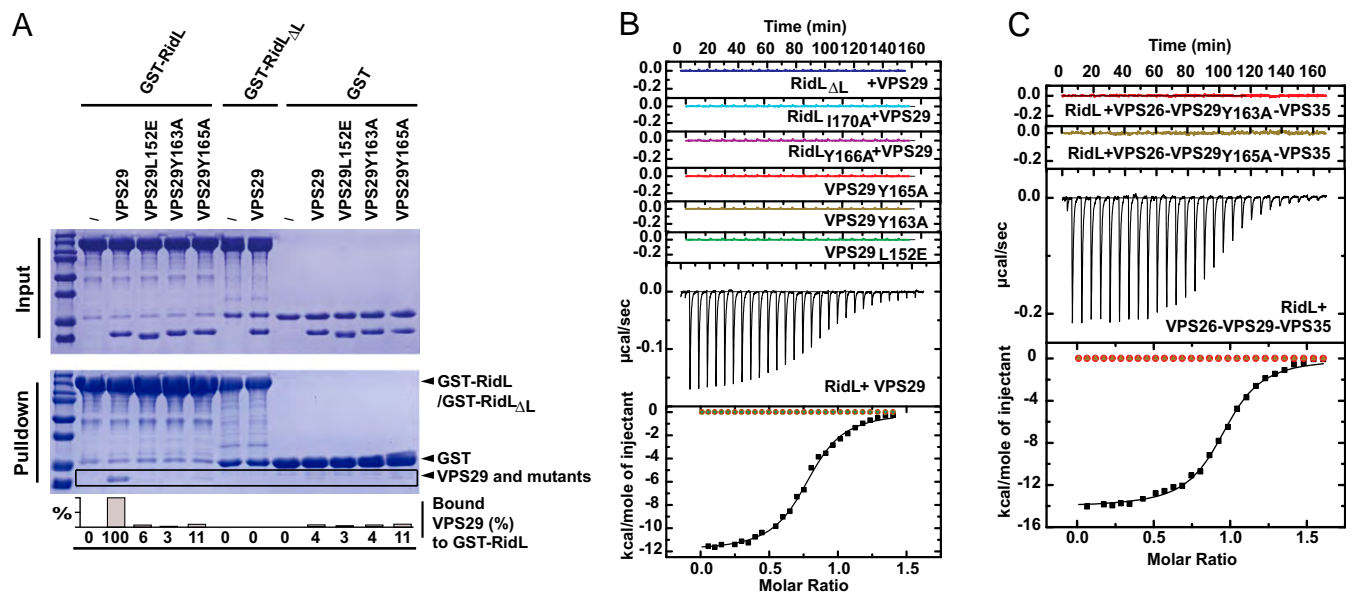


Fig. 5. Interface residues are critical for RidL–VPS29 complex formation. (A) Coomassie blue-stained SDS/PAGE gels showing pull-down of VPS29 wild-type or the different mutants of this protein by either GST-RidL, GST-RidL Δ L or GST (control). Controls with GST-tag alone exhibit minimal nonspecific binding. The graph beneath the pull-down corresponds to densitometry-based quantification of the amount of VPS29 precipitated by the respective bait-coated beads. (B) ITC thermograms for the titration of RidL, RidL Δ L or RidL point mutants (Y166A, I170D) into solutions containing either VPS29 or mutated versions of this protein. (C) ITC thermograms for the titration of RidL into solutions containing either retromer (black) and retromer containing VPS29_{Y163A} (red) or retromer containing VPS29_{Y165A} (brown).

association of RidL with retromer-coated vacuolar and tubular endosomes.

RidL Competes with Cellular Ligands for the Same Binding Site on VPS29. VPS29 contains two patches of conserved hydrophobic residues on opposite surfaces (25, 26). While one patch was reported to bind VPS35 (19, 25), the opposite patch mediates the association with the Rab7 GAP TBC1D5 (27) and the adaptor protein VARP (17). Interestingly, the pocket on VPS29 for binding TBC1D5 and VARP involves the same cluster of hydrophobic residues found here to interact with RidL (Figs. 3 and 5). Indeed, a comparison between the crystal structures of VPS29 in complex with a peptide derived from TBC1D5_{TBC} (PDB ID code 5GTU) and the structure of VPS29 in complex with the hairpin loop of RidL (Fig. 3) revealed a common loop pattern with a conserved P-L/I motif as the linchpin of the interactions (residues I170–P171 in RidL; P141–L142 in TBC1D5) (Fig. 7A). Previously reported ITC titration assays of recombinant TBC1D5_{TBC} or VARP Cys-rich motifs to VPS29 yielded similar K_d values (5–13 μ M) for both complexes in the low micromolar range, following a 1:1 stoichiometry (17, 27). As described above, RidL and RidL_{1–236} exhibited a 1.5–2 log higher affinity for VPS29 and retromer (151 nM and 181 nM, respectively), which suggests that RidL could compete effectively against endogenous ligands. However, it has also been described that the association of TBC1D5_{TBC} with retromer involves a binary interaction through both VPS29 and VPS35, with a K_d value of \sim 220 nM (27) and, thus, closer to that observed herein for RidL binding to retromer (Fig. 1). Our ITC-derived K_d value for the interaction between TBC1D5_{TBC} and retromer was comparable, although slightly higher, to those reported earlier (\sim 450 nM vs. \sim 220 nM) (27), suggesting a weaker binding of TBC1D5 to retromer than RidL (Fig. S8A–D).

To examine if RidL could compete with TBC1D5_{TBC} for binding to retromer in solution, a preformed TBC1D5_{TBC}–retromer complex was incubated with an equimolar amount of RidL (Fig. 7B and D), and the mixture was subsequently frac-

tionated by SEC. In the absence of RidL, TBC1D5_{TBC} and retromer migrated together, with enrichment in the fast-eluting fractions (10.5–12.5 mL). In contrast, upon addition of RidL, TBC1D5_{TBC} was present almost exclusively in late-eluting fractions (14–15 mL), consistent with its displacement from retromer, while RidL coeluted with retromer (Fig. 7B and D). Thus, under the conditions tested here, RidL outcompeted TBC1D5_{TBC} for binding to retromer. Importantly, the mutant protein RidL Δ L was unable to disrupt the preformed TBC1D5_{TBC}–retromer complex under the same conditions (Fig. 7B and D), indicating that VPS29 binding was required for TBC1D5 displacement. In contrast, incubation of a preformed RidL–retromer complex with an equimolar amount of TBC1D5_{TBC} did not result in the ejection of RidL from the retromer complex (Fig. S8E and F), showing that RidL can resist displacement from VPS29 by cellular ligands.

To evaluate if RidL could compete with VARP in solution, we designed a VARP construct containing the two cysteine-rich domains involved in direct binding to VPS29 (VARPc, residues 396–746) and performed ITC and gel-filtration competition analysis. The ITC experiments showed that VARPc associates with retromer with a K_d of \sim 3 μ M and that two independent point mutations on VPS29 (Y165A and Y163A) completely abolished the interaction (Fig. S8C and D). These results confirmed that VARP associates through the same VPS29 conserved pocket to retromer but with a weaker affinity than RidL. In addition, we analyzed the ability of RidL to displace VARPc from retromer by SEC. Due to the similar molecular weight between VARPc and the VPS26 subunit of retromer, we used a VPS29–VPS35 reconstituted retromer subcomplex to facilitate the visualization of proteins. As expected, RidL outcompeted VARPc for binding to VPS29–VPS35 but the mutant RidL Δ L was unable to disrupt the preformed VARPc–VPS29–VPS35 complex (Fig. 7C and E). In contrast, preformed RidL–VPS29–VPS35 complex was not outcompeted by VARPc under the same conditions (Fig. S8G and H). These experimental results confirm that in solution RidL efficiently competed with VARP for binding to retromer.

We also examined if RidL could displace TBC1D5 from retromer in cells. In agreement with our biochemical experiments,

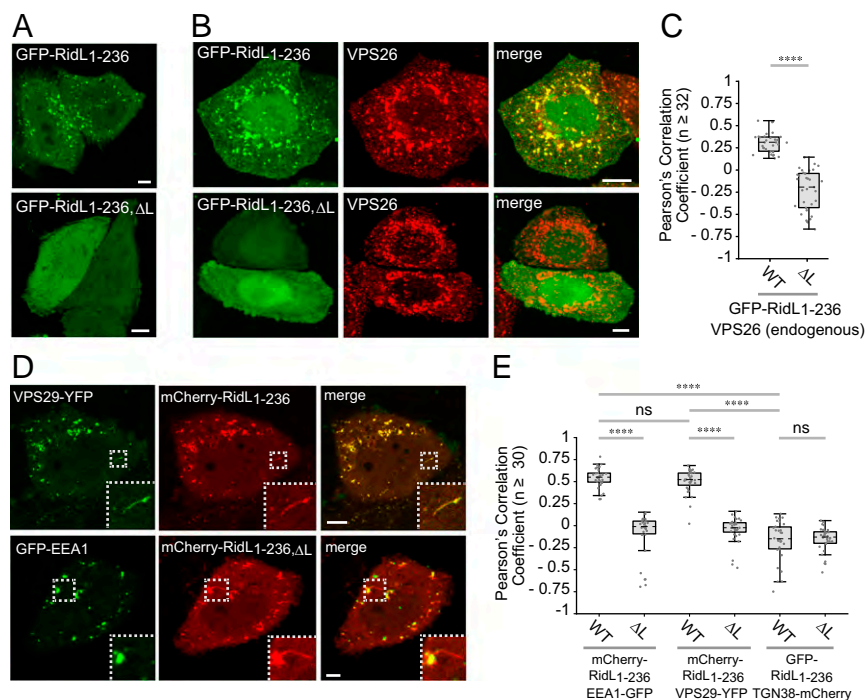


Fig. 6. RidL localizes to endosomal compartments occupied by retromer. (A) HeLa cells were transfected with plasmids encoding either GFP-RidL₁₋₂₃₆ or GFP-RidL_{1-236,ΔL} and imaged live 24 h later. (Scale bars, 5 μm.) (B) HeLa cells were transfected with plasmids encoding either GFP-RidL₁₋₂₃₆ or GFP-RidL_{1-236,ΔL} and fixed 24 h before staining with antibodies against the core retromer subunit VPS26. Notice the colocalization of GFP-RidL₁₋₂₃₆ with VPS26 on endosomal compartments. (Scale bars, 5 μm.) (C) Colocalization of GFP-RidL₁₋₂₃₆ or GFP-RidL_{1-236,ΔL} with endogenous VPS26 in fixed cells was quantified in at least 32 cells across three independent experiments using ImageJ. Pearson's correlation coefficient values for colocalization in individual cells are shown in the plots (*****P* < 0.0001 by unpaired *t* test with equal SD). (D) HeLa cells were cotransfected with plasmids encoding mCherry-RidL₁₋₂₃₆ or either YFP-VPS29 or early endosome marker EEA1-GFP, and imaged live. Still images were taken from [Movies S1](#) (VPS29) and [S2](#) (EEA1). (Scale bars, 5 μm.) Insets show mCherry-RidL₁₋₂₃₆⁺ tubules (magnification: *Top*, 3.6×; *Bottom*, 2.5×). Notice the association of mCherry-RidL₁₋₂₃₆ with vacuolar endosomes labeled with YFP-VPS29 and EEA1-GFP, and emanating tubules labeled with YFP-VPS29 but not EEA1-GFP. (E) Colocalization of GFP-RidL₁₋₂₃₆ or GFP-RidL_{1-236,ΔL} with expressed EEA1-GFP, VPS29-YFP, or TGN38-mCherry in live cells was quantified in at least 30 cells across three independent experiments using ImageJ. Pearson's correlation coefficient values for colocalization in individual cells are shown in the scatter plots (*****P* < 0.0001, by unpaired *t* test with equal SD). ns, not significant.

overproduction of mCherry-RidL₁₋₂₃₆, but not mCherry-RidL_{1-236,ΔL}, abrogated the association of GFP-TBC1D5 with endosomes (Fig. 7 *F* and *G*). These results demonstrated that RidL can effectively block a cellular ligand from binding to retromer, both in vitro and in vivo. We also observed weaker VARP-GFP fluorescence on endosomes from mCherry-RidL₁₋₂₃₆-overproducing cells relative to mCherry-RidL_{236,ΔL}-overproducing cells (Fig. S9). However, a fraction of VARP-GFP remained associated with endosomes even in mCherry-RidL₁₋₂₃₆-overproducing cells (Fig. S9), suggesting that VARP has additional determinants for recruitment to endosomes.

Discussion

In this study, we have determined the structure of the *L. pneumophila* effector RidL, both alone and in complex with the human VPS29–VPS35C retromer subcomplex, and deciphered the molecular mechanism by which RidL is targeted to endosomal membranes. The crystal structure of RidL₁₋₈₆₆ is comprised of four domains that show neither sequence nor structural homology to other proteins. Targeting of RidL to recycling endosomes was solely dependent on a hairpin loop (amino acids 163–176) that binds to a conserved patch of exposed hydrophobic residues on VPS29. Interestingly, the binding mode of RidL with VPS29 was remarkably similar to that of the endogenous factor TBC1D5 (27). Indeed, TBC1D5 and VARP use the same binding patch on VPS29 for their association with retromer (17, 27) but bind with lower affinities compared with RidL. Consistent with these results, RidL effectively competed with TBC1D5 for binding to retromer in vitro and in vivo. RidL also outcompeted VARPc for binding to

retromer in vitro, but only partially displaced VARP from endosomes in vivo (Fig. 7 and Fig. S9). This latter observation suggests that VARP has additional means of association with endosomes.

TBC1D5 possesses GAP activity toward Rab7, which has been proposed to promote retromer disassociation from membranes (14). During nutrient starvation, TBC1D5 can also associate with LC3, a protein involved in autophagy, which shuttles it away from its inhibitory interaction with retromer to promote GLUT1 recycling to the plasma membrane (47). These observations are evidence that the binding site on VPS29 may serve as a switch between mutually exclusive interactions to enhance or restrict retromer function within particular trafficking pathways. Furthermore, the recent identification of retriever, a related heterotrimer that shares the VPS29 subunit but recycles different cargoes, provides an even larger diversity of sorting events dependent upon VPS29 (48). Interestingly, endogenous retromer and retriever overlap on the same subdomains of endosomal membranes (48), so it is possible that RidL recruitment to these subdomains could also involve retriever. Our study suggests that RidL exploits the conserved pocket on VPS29 through molecular mimicry to efficiently reach specific endosomal subdomains where various cargo-retrieval machineries are located.

Recent studies have shown that *L. pneumophila* mutants lacking *ridL* exhibit a mild growth defect in the amoeban host *Dictyostelium discoideum* as well as in mouse RAW264.7 macrophages, while depletion of some (VPS26A/B, VPS29) but not all retromer subunits by RNA interference caused a subtle stimulation in *L. pneumophila* growth in HeLa cells (44). Similarly, ectopic production of RidL in HeLa cells or infection of

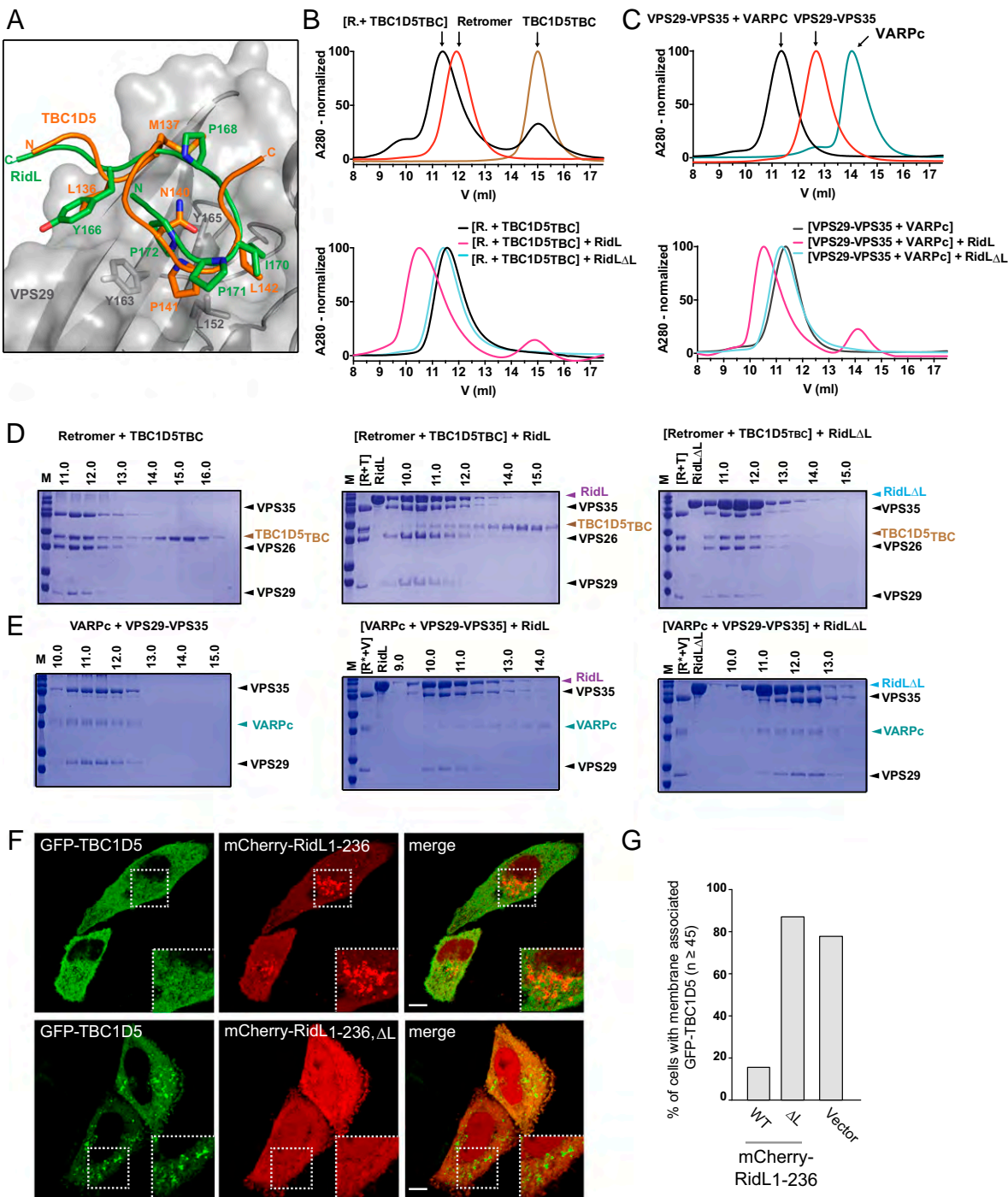


Fig. 7. RidL competes with TBC1D5_{TBC} for binding to retromer. (A) Superposition of the VPS29/TBC1D5-Ins1 complex (PDB ID code 5GTU) shown in orange and the VPS29-VPS35-RidL_{loop} complex (green). (B, Upper) Gel-filtration chromatogram of the complex formed by retromer and TBC1D5_{TBC} (black) at a molar ratio of 1:1.5. The chromatograms of retromer (red) and TBC1D5_{TBC} (brown) are also shown. (Lower) Competition assay between RidL and TBC1D5_{TBC} for retromer binding. Gel-filtration chromatogram of the complex formed by retromer and TBC1D5_{TBC} (black), after incubation with RidL at a 1:1 molar ratio (magenta) and after the incubation with RidL_{ΔL} (cyan). (C, Upper) Gel-filtration chromatogram of the complex formed by VPS29-VPS35 and VARPC (black) at 1:1 molar ratio. The chromatograms of VPS29-VPS35 (red) and VARPC (green) are also shown. (Lower) Competition assay between RidL and VARPC for retromer binding. Gel-filtration chromatogram of the complex formed by VPS29-VPS35 and VARPC (black), after incubation with RidL (magenta) and after the incubation with RidL_{ΔL} (cyan). (D and E) Coomassie blue-stained SDS/PAGE gels of the corresponding fractions shown in the chromatograms, with the position of each protein band indicated on the right. Gels with the corresponding fractions of the competition assays between RidL and RidL_{ΔL} are shown in the Center and on the Right, respectively. (F) Overproduction of mCherry-RidL₁₋₂₃₆ but not mCherry-RidL_{1-236,ΔL} displaces GFP-TBC1D5 from endosomes. HeLa cells were cotransfected with plasmids encoding GFP-TBC1D5 and either mCherry-RidL₁₋₂₃₆ or mCherry-RidL_{1-236,ΔL} and imaged live after 24 h. *Inset* shows endosomal recruitment of either mCherry-RidL₁₋₂₃₆ or GFP-TBC1D5 in representative images of three independent repeats (magnification: *Top*, 1.8 \times , *Bottom*, 1.6 \times). (Scale bars, 5 μ m). (G) A minimum of 45 cells coexpressing GFP-TBC1D5 and either mCherry-RidL₁₋₂₃₆, mCherry-RidL_{1-236,ΔL}, or mCherry vector were assessed for association of GFP-TBC1D5 signal with intracellular membranes. Bar graphs report percentage of the cell population displaying membrane-associated GFP-TBC1D5 for each condition in a single matched experiment.

macrophages by wild-type *L. pneumophila* but not *L. pneumophila* mutants lacking RidL inhibited retrograde trafficking of subunit B from Shiga toxin or cholera toxin, two well-established model cargos for analyzing retromer-dependent retrograde transport (44). These data hint at a role for retromer in restricting *L. pneumophila* proliferation, and that RidL is translocated by *L. pneumophila* to counteract retromer function (44). However, some of the findings presented here argue that RidL has a more nuanced effect on retromer function. For example, although high levels of RidL compete with cellular ligands, such as TBC1D5, for VPS29 binding in transiently transfected HeLa cells (Fig. 7), the number of RidL molecules translocated by a single *L. pneumophila* bacterium into infected host cells is likely orders-of-magnitude lower than the copy number of retromer molecules, making it improbable that competitive binding to VPS29, which is an abundant protein present in at least two endosomal complexes, will cause a global collapse of endosomal recycling within cells. In addition, our SEC-MALS analyses demonstrated that RidL₁₋₈₆₆ binding to retromer did not preclude retromer dimerization (Fig. S4), a process that has been speculated to contribute to coat assembly (20), suggesting that retromer might still be able to assemble into a coat-like lattice on recycling endosomal tubules even in complex with RidL. Furthermore, the presence of exogenous RidL did not disturb the localization of retromer subunits to endosomal membranes or the formation of tubular structures emanating from those compartments (Fig. 6), suggesting that retrograde transport proceeded normally even in the presence of RidL. Thus, our findings support a VPS29-dependent membrane targeting mechanism rather than a widespread inhibitory activity.

Retromer and retriever have been predicted to share similar architecture and to spatially overlap in endosomal subdomains despite interacting with different combinations of SNX proteins for their association with membranes (48). RidL and the SNXs linked to retromer and retriever are PI3P-binding proteins. We have not found structural evidence of a PI3P-binding site in RidL₁₋₈₆₆. Despite extensive cocrystallization experiments of RidL₁₋₈₆₆ with PI3P analogs, we were unable to identify any extra density associated with the protein, possibly due to steric occlusion in the crystal packing, ionic strength in the crystallization solution, or because PI3P binds to the unsolved C-terminal region of RidL (residues 867–1167). Nonetheless, phosphoinositide-binding domains are usually complemented by other protein-binding domains to integrate the simultaneous binding of multiple factors in the same membrane. This sort of coincidence detection can facilitate submembrane localization, increase the apparent affinity due to the avidity effect or trigger a cellular process as part of a multivalent interaction (49).

At this time, we can only speculate about the function of RidL during *L. pneumophila* infection. RidL is a large effector composed of multiple domains with very low structural similarity to other known proteins; thus, it is probable that concomitant interactions with VPS29 and other, yet unidentified, factors could direct RidL specifically and efficiently to the LCV to interfere with lysosome fusion. This is consistent with the observation that VPS29 localizes to LCVs in a Dot/Icm-dependent, but RidL-independent manner and that LCVs formed by Δ RidL accumulated more lysosome-associated membrane protein 1 (44). Interestingly, in yeast, the release of the Rab-like Rab7/Ypt7 from retromer favors the interaction with the HOPS tethering complex, which in turn promotes SNARE-dependent fusion of the late endosome with vacuoles (50). Thus, it is conceivable that RidL could prevent Rab7 dissociation from retromer by displacing TBC1D5 to restrain the interaction with the mammalian HOPS–RILP tethering complex (51) and ultimately impede the fusion with lysosomes.

In conclusion, our results have shown that RidL interacts with VPS29 through a hairpin loop closely mimicking the natural TBC1D5 interaction and that this binding targets RidL to sites where retromer is present, most probably outcompeting cellular

ligands. These findings mechanistically explain the targeting of RidL to subcellular membrane domains and pave the way for future research to define the ultimate function of RidL during *L. pneumophila* infection.

Materials and Methods

Recombinant Protein Production. The different constructs encoding RidL (RidL, RidL₃₀₋₂₃₆, RidL₁₋₂₃₆, RidL₁₋₄₂₀, RidL₁₋₈₆₆, RidL₈₆₆₋₁₁₆₇, RidL Δ L, RidL_{Y166A}, RidL_{L170D}), human VPS29 and VPS29 mutants (VPS29_{Y165A}, VPS29_{Y163A}, VPS29_{L152E}), and VARPC (residues 396–746) were cloned into the vector pGST-Parallel2 (52) using restriction enzymes and Gibson assembly. VPS29_{Y163A} and VPS29_{Y165A} were also cloned into pmr101A (American Type Culture Collection) to form the mutated retromer complex. DNA encoding human TBC1D5_{TBC} (residues 1–419) was cloned into the pDB-HisGST vector (DNASU; ID: EvNO00085134). Production of native proteins was performed in *E. coli* BL21(DE3), whereas proteins labeled with Seleno-L-methionine (SeMet) were isolated from *E. coli* B834(DE3), as described previously (20).

Protein Crystallization and Structure Determination. Crystals were grown by hanging-drop vapor diffusion at 18 °C. Native and SeMet derivative crystals of RidL₁₋₈₆₆ were obtained by mixing 1 μ L of 100–120 μ M protein with 1 μ L of well solution containing 0.4 M sodium fluoride, 14–16% (wt/vol) polyethylene glycol (PEG) 3350, and 0.1 M Bis-Tris propane pH 7.5. The crystallization of native and SeMet-labeled complexes of RidL₁₋₂₃₆–VPS29–VPS35C was achieved by mixing 1 μ L of the purified complex at 7.5 mg/mL and 1 μ L of the precipitant solution containing 0.1 M sodium chloride, 0.1 M Tris pH 8.0 and 4–8% (vol/vol) PEG6000. The RidL₁₋₈₆₆ structure was solved using experimental (SeMet SAD) phasing followed by density modification. The structure of the RidL₁₋₂₃₆–VPS29–VPS35C complex was solved by molecular replacement combined with SAD phases (SAD-MR) using the known structure of VPS29–VPS35C complex (PDB ID code 2R17) and the anomalous signal of two crystals; one in which the VPS29–VPS35 subcomplex was labeled with SeMet, and the second in which only RidL₁₋₂₃₆ was labeled with SeMet. VPS29–VPS35C–RidL_{loop} was solved by MR with PHASER using the VPS29–VPS35C complex (PDB ID code 2R17) as a search model. The crystallographic information is summarized in Table S1.

ITC Assays. ITC experiments were conducted on a VP-ITC microcalorimeter (MicroCal) at 25 °C. Before each experiment, proteins were dialyzed overnight at 4 °C against 50 mM Hepes 7.5, 300 mM NaCl, and 0.5 mM TCEP, and degassed for 5 min in a ThermoVac sample degasser before titration. Each experiment involved one initial 2- μ L injection (not used in data fitting), followed by 27 injections of 10- μ L aliquots with a spacing of 360 s between injections. Data were analyzed using the Origin ITC software package supplied by MicroCal by fitting a “one set of sites” model to the binding isotherm. For the ITC analysis of the binding between RidL and retromer, 80–110 μ M RidL (full-length or RidL₃₀₋₂₃₆) was injected into the sample cell containing 9–11 μ M of different combinations of retromer subunits (VPS26–VPS29–VPS35, VPS29–VPS35C, or VPS29). The analysis of the interaction between RidL and VPS29 was performed by titrating 100–120 μ M of RidL into 10 μ M of different VPS29 mutants (Y165A, Y163A, L152E, and VPS26–VPS29_{Y163A}–VPS35) or 150 μ M RidL Δ L, RidL_{Y166A}, or RidL_{L170D} into 10 μ M VPS29. For the ITC analysis of the binding between TBC1D5_{TBC} and retromer, 200–220 μ M TBC1D5_{TBC} was titrated into 9–12 μ M of the different retromer proteins (retromer, VPS26–VPS29_{Y163A}–VPS35, VPS29, or the different VPS29 mutants). Finally, the interaction between VARPC and the different retromer proteins was carried out by titrating 140–150 μ M into 10 μ M of retromer variants. Data are the mean of a minimum of three independent runs for each experiment.

GST-Tagged Pull-Down Experiments. For the identification of the region of RidL that binds to retromer, 20 μ M VPS29-[GST-VPS35C] was incubated with 20 μ M RidL or different RidL constructs for 1 h at 4 °C in buffer C. Then, 20 μ L of equilibrated Glutathione Sepharose beads (GE Healthcare) were added to 70 μ L of the protein mixture and incubated for 1 h at 4 °C with gentle agitation. Beads were washed three times with 1 mL buffer C followed by 5 min centrifugation at 3,000 \times g. Bound proteins were eluted with SDS-containing sample buffer, resolved by SDS/PAGE and visualized by Coomassie blue staining.

Precipitation assays with VPS29 mutants were performed following the same protocol as described above but with the GST-tag present on RidL or RidL Δ L.

Competitive Binding Assay. For the competition assay, preformed complexes were separated by gel-filtration in buffer C to remove excess protein. The purified complexes were incubated with an equimolar amount of RidL, in the

case of the complex formed by TBC1D5_{TBC} and retromer or VARPc and VPS29–VPS35, or TBC1D5_{TBC} or VARPc, in the case of the complex of RfdL and retromer. The protein mixtures were once again separated by gel-filtration in buffer E.

Full experimental procedures and associated references can be found in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Ander Vidaurrezaga (Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias) for technical assistance and Devanand Bondage (National Institute of Child Health and Human Development) for proliferation assays of *Legionella pneumophila*. This study made use of the

- Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *EMBO J* 30:3481–3500.
- Scott CC, Vacca F, Gruenberg J (2014) Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* 31:2–10.
- Chi RJ, Harrison MS, Burd CG (2015) Biogenesis of endosome-derived transport carriers. *Cell Mol Life Sci* 72:3441–3455.
- Hierro A, Gershlick DC, Rojas AL, Bonifacino JS (2015) Formation of tubulovesicular carriers from endosomes and their fusion to the trans-Golgi network. *Int Rev Cell Mol Biol* 318:159–202.
- van Weering JR, Verkade P, Cullen PJ (2010) SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol* 21:371–380.
- Burd C, Cullen PJ (2014) Retromer: A master conductor of endosome sorting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016774.
- Seaman MN (2012) The retromer complex—Endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci* 125:4693–4702.
- Cullen PJ, Korswagen HC (2011) Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol* 14:29–37.
- Johannes L, Wunder C (2011) The SNXy flavours of endosomal sorting. *Nat Cell Biol* 13:884–886.
- Lucas M, Hierro A (2017) Retromer. *Curr Biol* 27:R687–R689.
- Teasdale RD, Collins BM (2012) Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: Structures, functions and roles in disease. *Biochem J* 441:39–59.
- Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS (2007) Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Biol* 27:1112–1124.
- Rojas R, et al. (2008) Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* 183:513–526.
- Seaman MN, Harbour ME, Tattersall D, Read E, Bright N (2009) Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5. *J Cell Sci* 122:2371–2382.
- Harrison MS, et al. (2014) A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:267–272.
- Gomez TS, Billadeau DD (2009) A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell* 17:699–711.
- Hesketh GG, et al. (2014) VARP is recruited on to endosomes by direct interaction with retromer, where together they function in export to the cell surface. *Dev Cell* 29:591–606.
- Fukuda M (2016) Multiple roles of VARP in endosomal trafficking: Rabs, retromer components and R-SNARE VAMP7 meet on VARP. *Traffic* 17:709–719.
- Hierro A, et al. (2007) Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 449:1063–1067.
- Lucas M, et al. (2016) Structural mechanism for cargo recognition by the retromer complex. *Cell* 167:1623–1635.e14.
- Shi H, Rojas R, Bonifacino JS, Hurley JH (2006) The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 13:540–548.
- Collins BM, et al. (2008) Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic* 9:366–379.
- Gallon M, et al. (2014) A unique PDZ domain and arrestin-like fold interaction reveals mechanistic details of endocytic recycling by SNX27-retromer. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E3604–E3613.
- Clairfeuille T, et al. (2016) A molecular code for endosomal recycling of phosphorylated cargos by the SNX27-retromer complex. *Nat Struct Mol Biol* 23:921–932.
- Collins BM, Skinner CF, Watson PJ, Seaman MN, Owen DJ (2005) Vps29 has a phosphoesterase fold that acts as a protein interaction scaffold for retromer assembly. *Nat Struct Mol Biol* 12:594–602.
- Wang D, et al. (2005) Crystal structure of human vacuolar protein sorting protein 29 reveals a phosphodiesterase/nuclease-like fold and two protein-protein interaction sites. *J Biol Chem* 280:22962–22967.
- Jia D, et al. (2016) Structural and mechanistic insights into regulation of the retromer coat by TBC1d5. *Nat Commun* 7:13305.
- Diamond Light Source (Oxfordshire, United Kingdom), the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France), and the ALBA synchrotron beamline BL13-XALOC, funded in part by the Horizon 2020 programme of the European Union, iNEXT (H2020 Grant 653706). We thank all the staff from these facilities for technical and human support. This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Grant BFU2014-59759-R (to A.H.); the Severo Ochoa Excellence Accreditation SEV-2016-0644; and the Intramural Program of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (Projects ZIA HD001607 and ZIA HD008893). M.R.-M. is supported by a pre-doctoral fellowship from the Basque Government (PRE_2016_2_0249).
- Personnic N, Bärlocher K, Finsel I, Hilbi H (2016) Subversion of retrograde trafficking by translocated pathogen effectors. *Trends Microbiol* 24:450–462.
- Groppelli E, Len AC, Granger LA, Jolly C (2014) Retromer regulates HIV-1 envelope glycoprotein trafficking and incorporation into virions. *PLoS Pathog* 10:e1004518.
- Popa A, et al. (2015) Direct binding of retromer to human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 mediates endosome exit during viral infection. *PLoS Pathog* 11:e1004699.
- Pim D, Broniarczyk J, Bergant M, Playford MP, Banks L (2015) A novel PDZ domain interaction mediates the binding between human papillomavirus 16 L2 and sorting nexin 27 and modulates virion trafficking. *J Virol* 89:10145–10155.
- Kingston D, et al. (2011) Inhibition of retromer activity by herpesvirus saimiri tip leads to CD4 downregulation and efficient T cell transformation. *J Virol* 85:10627–10638.
- Mirrahimi KM, et al. (2015) Global mapping of the Inc-human interactome reveals that retromer restricts *Chlamydia* infection. *Cell Host Microbe* 18:109–121.
- Paul B, et al. (2017) Structural basis for the hijacking of endosomal sorting nexin proteins by *Chlamydia trachomatis*. *eLife* 6:e22311.
- Elwell CA, et al. (2017) *Chlamydia* interfere with an interaction between the mannose-6-phosphate receptor and sorting nexins to counteract host restriction. *eLife* 6:e22709.
- Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: Making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* 7:13–24.
- Horwitz MA (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 158:2108–2126.
- Horwitz MA (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 158:1319–1331.
- Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: Implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* 114:4637–4650.
- Swanson MS, Isberg RR (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* 63:3609–3620.
- Ensminger AW (2016) *Legionella pneumophila*, armed to the hilt: Justifying the largest arsenal of effectors in the bacterial world. *Curr Opin Microbiol* 29:74–80.
- Qiu J, Luo ZQ (2017) *Legionella* and *Coxiella* effectors: Strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol* 15:591–605.
- Zusman T, et al. (2007) The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol Microbiol* 63:1508–1523.
- Finsel I, et al. (2013) The *Legionella* effector RfdL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14:38–50.
- Holm L, Rosenstrom P (2010) Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* 38:W545–W549.
- Norwood SJ, et al. (2011) Assembly and solution structure of the core retromer protein complex. *Traffic* 12:56–71.
- Roy S, Leidal AM, Ye J, Ronen SM, Debnath J (2017) Autophagy-dependent shuttling of TBC1D5 controls plasma membrane translocation of GLUT1 and glucose uptake. *Mol Cell* 67:84–95.e5.
- McNally KE, et al. (2017) Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling. *Nat Cell Biol* 19:1214–1225.
- Moravcevic K, Oxley CL, Lemmon MA (2012) Conditional peripheral membrane proteins: Facing up to limited specificity. *Structure* 20:15–27.
- Purushothaman LK, Arlt H, Kuhlee A, Raunser S, Ungermann C (2017) Retromer-driven membrane tubulation separates endosomal recycling from Rab7/Ypt7-dependent fusion. *Mol Biol Cell* 28:783–791.
- van der Kant R, et al. (2015) Characterization of the mammalian CORVET and HOPS complexes and their modular restructuring for endosome specificity. *J Biol Chem* 290:30280–30290.
- Sheffield P, Garrard S, Derewenda Z (1999) Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of “parallel” expression vectors. *Protein Expr Purif* 15:34–39.