

Investigación

Rol del complejo motor dineína/dinactina de la célula hospedadora en la biogénesis de la vacuola que contiene a *Coxiella burnetii*

Role of the dynein/dynactin motor complex of the host cell in the biogenesis of the vacuole containing *Coxiella burnetii*.

AUTORES

RODOLFO M. ORTIZ FLORES (1 ¶)
JESÚS S. DISTEL (1 ¶)
MILTON O. AGUILERA (1 ¶)
WALTER BERÓN (1*)

1 - Instituto de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo - CONICET, Mendoza, 5500, Argentina.

¶ - Los autores contribuyeron de igual forma a este trabajo.

***** - Autor correspondiente

RESUMEN

En el transporte retrógrado participa el complejo motor dineína/dinactina. *Coxiella burnetii* (Cb) es un patógeno intracelular obligado que transita a través de la vía fagocítica para formar la vacuola replicativa que contiene a Cb (VCC). Existe poca evidencia acerca de la interrelación entre el tráfico intracelular de Cb y proteínas motoras. Para estudiar esa interrelación se analizó la sobreexpresión de las formas WT de las subunidades del complejo motor dineína/dinactina, y la sobreexpresión de las mutantes no funcionales respectivas, alterando la formación de la VCC. Nuestros resultados sugieren que los fagosomas que contienen *C. burnetii*, se transportan utilizando dineína/dinactina para formar la VCC, donde Cb se multiplica.

Palabras clave: *Coxiella burnetii*; dineína/dinactina.

ABSTRACT

In the retrograde transport, the dynein/dynactin motor complex is involved. Coxiella burnetii (Cb) is an obligate intracellular pathogen that transits through the phagocytic pathway to form the replicative vacuole containing Cb (VCC). There is little evidence about the interrelationship between intracellular Cb trafficking and motor proteins. To study this interrelation, we analysed the overexpression of the WT forms of the dynein/dynactin motor complex subunits, and overexpression of the respective non-functional mutants, altering the formation of the VCC. Our results suggest that C. burnetii-containing phagosomes are transported using dynein/dinactin to form the VCC, where Cb is multiplied.

Key words: *Coxiella burnetii*; dynein/dynactin.

INTRODUCCIÓN

Las dineínas citoplasmáticas son en realidad grandes y complejos motores compuestos por dos cadenas pesadas, dos intermedias, una intermedia liviana y una liviana. La cadena pesada pertenece a la familia AAA ("ATPase associated

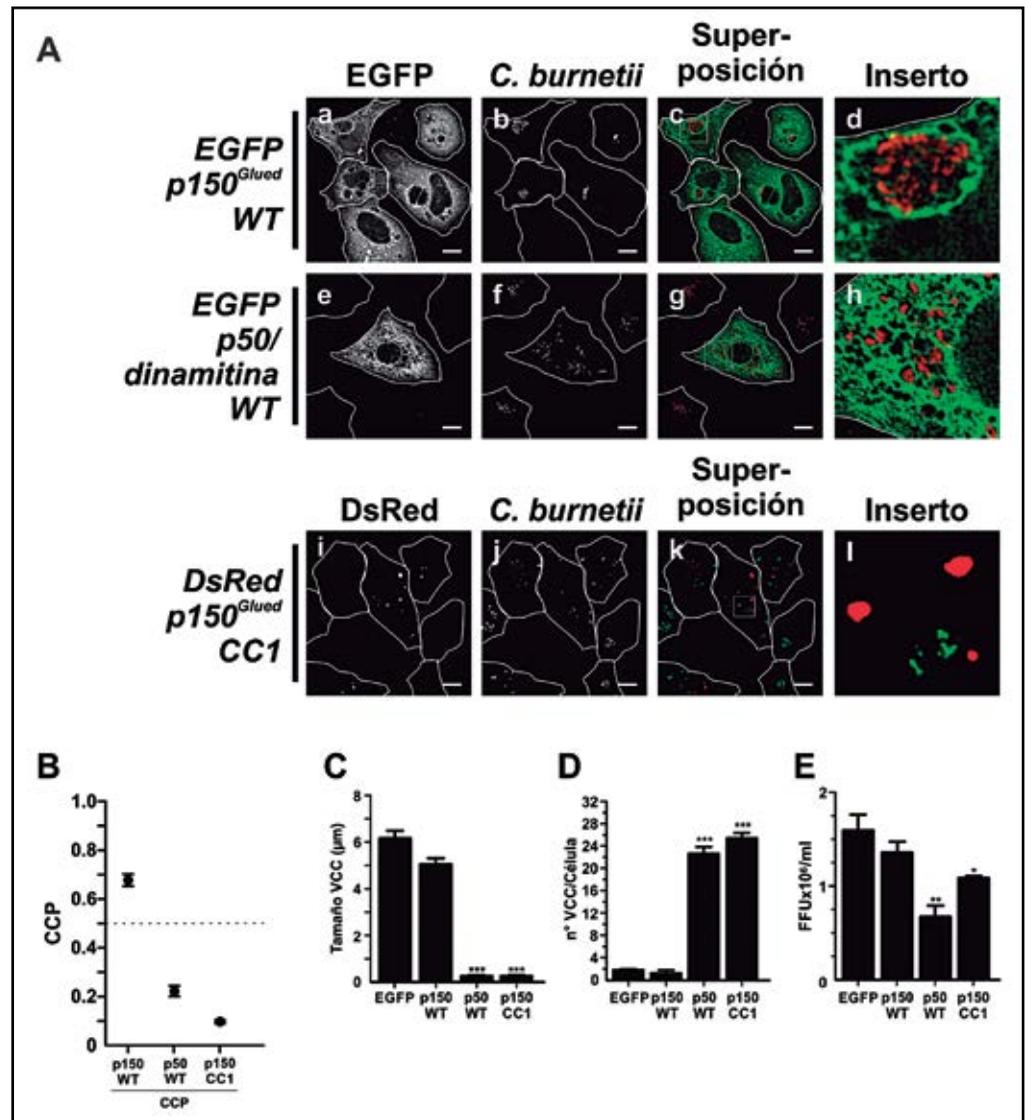
with different activities") de ATPasas y se pliega para formar un anillo heptamérico que posee una corta extensión "coiled-coil" a través de la cual se une a los microtúbulos, y un dominio extendido a través del cual se une a la segunda cadena pesada para formar un dímero y

a las cadenas intermedias y livianas. Si bien existen 7 sitios posibles de unión e hidrólisis de ATP dentro del dominio AAA, la hidrólisis en el sitio AAA1 es necesaria y suficiente para la motilidad a lo largo de los microtúbulos [1]. La dineína trabaja junto con otro complejo

Rol del complejo motor dineína/dinactina de la célula hospedadora en la biogénesis de la vacuola que contiene a *Coxiella burnetii*

Rodolfo M. Ortiz Flores; Jesús S. Distel; Milton O. Aguilera; Walter Berón

Figura 1: El complejo motor dineína/dinactina interviene en la formación de la VCC. Células HeLa previamente infectadas y transfectadas con lipofectamina™2000 fueron fijadas y procesadas para IFI. Anti-*C. burnetii* (Pseudocolor rojo en panel a - h, Pseudocolor verde en panel i - l). (A) Sobreexpresión en células HeLa de EGFP-p150gluedWT (panel a - d), EGFP-p50/dinamitinaWT (panel e - h) y DsRed-p150gluedCC1 (panel i - l). Barra = 10µm. (B) Gráfico de CCP mostrando correlación del constructo con la VCC. (C) Análisis estadístico de la cuantificación del tamaño de la VCC. (D) Análisis estadístico de la cuantificación del número de VCC por célula. (E) Análisis estadístico de la multiplicación bacteriana expresada en FFUx106/ml. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, a partir de tres ensayos independientes, contando treinta células por ensayo.



grande de proteínas, llamado dinactina que se requiere para prácticamente todas las funciones conocidas dineína [2]. Este complejo motor llamado dineína/dinactina, "camina" sobre el microtúbulo [3]. Su dirección y el tiempo que permanece unido este complejo, al microtúbulo, aún está en discusión. El complejo dinactina contiene muchas subunidades proteicas de interés, pero de todas, este manuscrito se centrará en dos de ella: p150glued y p50/dinamiti-

na. p150glued es uno de los componentes más extensos del complejo dinactina con sitios de contacto para interactuar con el microtúbulo, hacia la región N-terminal, sitios de unión para el complejo dineína (llamado coiled-coil), y sitios de unión con otros elementos del complejo, en la región C-terminal. Gracias a estos dominios, p150glued proporciona estabilidad al complejo motor dineína/dinactina, tanto para su movimiento, como para el transporte del cargo [4].

Por otro lado, autores han demostrado que la subunidad p50/dinamitina cumple una función central en este complejo ya que esta es quien dispone la unión de p150glued al complejo, y, por ende, la estabilidad del complejo motor dineína/dinactina, regulando la organización estructural de este. Además, se ha demostrado que este complejo está regulado por la expresión de esta proteína ya que al sobreexpresarla, se produce una desestabilización y disociación del

Rol del complejo motor dineína/dinactina de la célula hospedadora en la biogénesis de la vacuola que contiene a *Coxiella burnetii*

Rodolfo M. Ortiz Flores; Jesús S. Distel; Milton O. Aguilera; Walter Berón

complejo motor [5,6]. Para dilucidar el rol del complejo motor en la formación de la VCC, células HeLa previamente infectadas se transfectaron con los plásmidos EGFP-p150gluedWT, EGFP-p50/dinamitinaWT o DsRed-p150gluedCC1 (constructo truncado no funcional que inhibe la actividad del motor de dineína, previniendo la unión dineína/dinactina). En base al coeficiente de correlación de Pearson (CCP; mono-transfección) y el coeficiente de superposición de Mander (CSM expresado como M1 y M2; co-transfección) se determinó que p150gluedWT se reclutó a la VCC con un CCP>0.5, como se puede apreciar en la Figura 1.A (panel a - d) y 1.B, mientras que p50/dinamitinaWT o p150gluedCC1 no co-localizaron en la VCC. Tanto p50/dinamitinaWT como p150gluedCC1 se distribuyeron en forma dispersa [5] o en forma puntillada en el citoplasma (CCP<0.5 en ambos casos), respectivamente, similar a lo observado por otros autores [7,8] (Figura 1.A, panel e - h; y Figura 1.B). En pre-

sencia de p150gluedWT sobreexpresada las vacuolas presentaron un tamaño $5.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$, y un número de 1.5 ± 0.5 VCC/célula. Para el caso de p50/dinamitinaWT, el tamaño promedio de las vacuolas fue $0.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$, y el número de 23.0 ± 1.0 VCC/célula. En el caso de la sobreexpresión de p150gluedCC1, los parámetros de las vacuolas fueron tamaño $0.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ y número 26.0 ± 1.0 VCC/célula (Figura 1.C y 1.D). Cuando se analizaron las FFU, se pudo observar que la sobreexpresión de p50/dinamitinaWT o p150gluedCC1 redujeron significativamente la replicación bacteriana al 57.5% o al 30.0%, respectivamente. No se observó diferencias en el nivel de multiplicación bacteriana en células que sobreexpresan p150gluedWT (Figura 1.E). Estos resultados sugieren que el complejo motor se asocia a VCC y participa en su formación, como así también en la replicación intracelular de *C. burnetii*.

(Ver figura 1)

En este manuscrito se demuestra que

la unidad del motor p150glued sobreexpresada se recluta a una VCC típica. Interesantemente, cuando se sobreexpresa p50/dinamitina, se desarrollan pequeños fagosomas que se distribuyen en forma dispersa en el citoplasma. Esto se debe a que la expresión de este constructo perturba la función motora del complejo dineína/dinactina, logrando que p150glued se disocie de dicho complejo [5]. Similar efecto se demuestra durante la sobreexpresión de un mutante p150gluedCC1, que perturba la interacción dineína/dinactina y de esta manera, la actividad motora. Estos resultados demuestran el rol central del complejo motor dineína/dinactina en el proceso de formación de la vacuola donde reside *C. burnetii*. En este trabajo se confirma que el motor dineína/dinactina juega un papel importante en la formación de la VCC. Además, esto plantea un nuevo modelo en la infección por *C. burnetii*, que puede contribuir al entendimiento del mecanismo de supervivencia intracelular de este patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. CAVISTON JP, HOLZBAUR ELF. *Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport*. *Trends Cell Biol*. 2006;16: 530–537. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.002
2. SCHROER TA. *Dynactin*. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20: 759–779. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094623
3. CARTER AP, DIAMANT AG, URNAVICIUS L. *How dynein and dynactin transport cargos: A structural perspective*. *Curr Opin Struct Biol*. Elsevier Ltd; 2016;37: 62–70. doi:10.1016/j.sbi.2015.12.003
4. SIGLIN AE, SUN S, MOORE JK, TAN S, POENIE M, LEAR JD, ET AL. *Dynein and Dynactin Leverage Their Bivalent Character to Form a High-Affinity Interaction*. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0059453
5. BURKHARDT JK, ECHEVERRI CJ, NILSSON T, VALLEE RB. *Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution*. *J Cell Biol*. Rockefeller University Press; 1997;139: 469–84. doi:10.1083/jcb.139.2.469
6. JACQUOT G, MAIDOU-PEINDARA P, BENICHOUS S. *Molecular and functional basis for the scaffolding role of the p50/dynamitin subunit of the microtubule-associated dynactin complex*. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2010;285: 23019–31. doi:10.1074/jbc.M110.100602
7. CASENGHI M, BARR FA, NIGG EA. *Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome*. *J Cell Sci*. 2005;118.
8. FLORES-RODRIGUEZ N, ROGERS SS, KENWRIGHT DA, WAIGH TA, WOODMAN PG, ALLAN VJ. *Roles of dynein and dynactin in early endosome dynamics revealed using automated tracking and global analysis*. *PLoS One. Public Library of Science*; 2011;6: e24479. doi:10.1371/journal.pone.0024479