UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGÊNICOS

MARA ELISAMA DA SILVA JANUÁRIO

**Estudo da função de AP1 γ 2 e Alix no direcionamento de proteínas para
degradação em lisossomos ou liberação em vesículas extracelulares**

Ribeirão Preto

2017

MARA ELISAMA DA SILVA JANUÁRIO

**Estudo da função de AP1 γ 2 e Alix no direcionamento de proteínas para
degradação em lisossomos ou liberação em vesículas extracelulares**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luis Lamberti P. da Silva

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

daSilva-Januário, Mara Elisama.

Estudo da função de AP1 γ 2 e Alix no direcionamento de proteínas para degradação em lisossomos ou liberação em vesículas extracelulares. Ribeirão Preto, 2017.

119f. : il.

Dissertação (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP.

Orientador: Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva.

Palavras chaves: 1. MVB. 2. AP1 γ 1. 3. AP1 γ 2. 4. Complexo EGF-EGFR. 5. EVs. 6. Alix. 7. Nef.

Nome: daSilva-Januário, Mara Elisama

Título: Estudo da função de AP1 γ 2 e Alix no direcionamento de proteínas para degradação em lisossomos ou liberação em vesículas extracelulares.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força, pelas boas energias, por tudo.

Aos meus pais Lucimara e Carlos Alberto que sempre me amaram e me apoiaram. Eu devo a vocês a pessoa em que eu me tornei. Aos meus irmãos Carlos Alberto e Pedro Augusto por encherem a minha vida de alegria.

Ao meu esposo Yunan pelo amor e por sempre estar ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Lamberti P. da Silva a quem eu muito admiro pela confiança, pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Tráfego Intracelular de Proteínas, Érika, Cristina, Natália, Roberta, Lucas, Yunan, Julianne, Estela e Leonardo pela amizade e pelo apoio.

À Andréia pela amizade sincera, por me ajudar a fazer contas e pelas risadas.

Ao departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde este trabalho foi realizado, pela infraestrutura e apoio.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

***“Quando a educação não é libertadora,
o sonho do oprimido é ser o opressor”***

(Paulo Freire)

RESUMO

daSILVA-JANUÁRIO, M. E. **“Estudo da função de AP1 γ 2 e Alix no direcionamento de proteínas para degradação em lisossomos ou liberação em vesículas extracelulares”**. 2017. 119f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

A degradação lisossomal de proteínas de membrana endocitadas ocorre por meio do direcionamento destas proteínas para vesículas intralumenais (ILVs), formadas no lúmen dos corpos multivesiculares (MVBs), e subsequente fusão dos MVBs com lisossomos. Apesar de sua importância na degradação de proteínas transmembrana, os MVBs possuem outra importante função, a de produzir e liberar vesículas extracelulares (EVs). Neste processo os MVBs não se fundem com lisossomos, mas sim com a membrana plasmática o que resulta na liberação das vesículas residentes no interior dos MVBs para o meio extracelular.

Diversas proteínas participam do direcionamento de cargas para os MVBs. Os estudos que delinearam a via de tráfego mediada por AP1 concentraram-se nos complexos contendo a subunidade γ 1 que medeia o transporte de proteínas entre a rede trans-Golgi (TGN) e endossomos. Contudo, o genoma humano codifica uma segunda isoforma desta subunidade, denominada γ 2, e evidências presentes na literatura e também observadas por nosso grupo indicam que AP1 γ 2 pode regular uma via de tráfego distinta da via classicamente atribuída a AP1. Utilizando ensaios de *uptake* de EGF em condições onde foi realizado o KD de γ 1 ou γ 2, foi observado que o silenciamento de γ 2 prejudica a degradação de EGF internalizado por seu receptor. Efeito também observado para o próprio receptor de EGF (EGFR) em ensaios de biotinylation da superfície celular. Demonstrando que a degradação lisossomal do complexo EGF-EGFR pela via canônica dos MVBs requer o complexo AP1 γ 2, mas não AP1 γ 1. Em conjunto com este estudo também foi analisado o mecanismo molecular de direcionamento da proteína Nef do HIV-1 para os MVBs associados a liberação de EVs. A proteína Nef do HIV é determinante na modulação do ambiente intracelular favorecendo a replicação do vírus e progressão à AIDS. Nef é ativamente secretado em EVs e sua liberação pode levar a apoptose de células vizinhas receptoras dessas vesículas. Nef também medeia a redução dos níveis de CD4 e moléculas de MHC-I em EVs. Ainda não é conhecido o mecanismo molecular utilizado por Nef para ser exportado em EVs, mas sabe-se que Nef interage fisicamente com a proteína

acessória da maquinaria ESCRT, Alix, importante no processo de formação das ILVs e seleção das cargas que serão internalizadas nos MVBs. EVs coletadas de células HeLa e linfócitos T CD4⁺ silenciados para Alix demonstraram reduções significativas na liberação de Nef. Estes resultados indicam que Nef requer Alix para sua eficiente liberação em EVs.

Palavras-chave: 1. MVB. 2. AP1 γ 1. 3. AP1 γ 2. 4. Complexo EGF-EGFR. 5. EVs. 6. Alix. 7. Nef.

ABSTRACT

daSILVA-JANUÁRIO, M. E. **“Study of AP1 γ 2 and Alix function in the targeting of proteins for degradation in lysosomes or release in extracellular vesicles”**. 2017. 119f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Lysosomal degradation of endocytosed membrane proteins occurs through the targeting of these proteins to intraluminal vesicles (ILVs), formed in the multivesicular bodies (MVBs) lumen, and the subsequent fusion of MVBs with lysosomes. Despite its importance in the degradation of transmembrane proteins, MVBs have another important function, the production and release of extracellular vesicles (EVs). In this process, the MVBs do not fuse with lysosomes, but fuse with the plasma membrane resulting in the release of these vesicles that reside within MVBs to the extracellular environment.

Several proteins regulate the targeting of cargo to MVBs. Studies that delineated the functions of AP1 in protein trafficking, focused on complexes containing the γ 1 subunit, which mediates transport between trans-Golgi network (TGN) and endosomes. However, the human genome encodes a second isoform of this subunit, named γ 2. Evidences from the literature, as well as results from our research group, indicate that AP1 γ 2 regulates transport pathways that are distinct from the pathways classically attributed to AP1. By performing EGF-uptake assays under γ 1 or γ 2 knockdown (KD) conditions, it was observed that γ 2 is required for degradation of internalized EGF, effect also observed for the EGF receptor (EGFR) using cell surface biotinylation assays. These results demonstrate that the lysosomal degradation of the EGF-EGFR complexes via the canonical MVBs pathway requires the AP1 γ 2 complex, but not AP1 γ 1. In parallel with this study, we also analyzed the molecular mechanism of HIV-1 Nef targeting to MVBs associated with the EVs release. Nef is an important determinant in the modulation of the intracellular environment for efficient HIV replication and progression to AIDS. Nef is actively secreted via EVs and its release may lead to apoptosis of bystander acceptor cells. Moreover, Nef reduces the levels of CD4 and MHC-I molecules in EVs. Despite the importance of Nef release in EVs, the molecular mechanism used by Nef to be exported via EVs is unknown. Nef physically interacts with the ESCRT machinery accessory protein Alix, an important player in the process of ILVs formation and cargo selection. EVs released from HeLa cells and CD4⁺ T lymphocytes under Alix KD conditions demonstrated a significant

reduction in Nef release via EVs. These results indicate that Nef requires Alix for its efficient release in EVs.

Keywords: 1. MVB. 2. AP1 γ 1. 3. AP1 γ 2. 4. EGF-EGFR complex. 5. EVs. 6. Alix. 7. Nef.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1.As proteínas adaptadoras regulam o transporte de diversas proteínas carga no sistema de endomembranas da célula	5
2.2.O complexo AP1 e suas vias clássicas de transporte	7
2.3.O receptor de EGF como ferramenta para o estudo de vias canônicas do tráfego	8
2.4.Direcionamento dos MVBs para degradação lisossomal e para liberação de EVs	8
2.5.A maquinaria ESCRT	9
2.6.A proteína acessória Alix e seu papel no recrutamento de cargas para os MVBs	11
2.7.EVs contendo Nef desempenham um papel importante na patogenicidade do HIV-1.....	13
3. OBJETIVOS	16
3.1.Objetivo Geral.....	16
3.2.Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1.Cultura de células	18
4.2.Transfecções e RNA de interferência	18
4.3.Montagem e produção dos retrovírus para transdução de linfócitos (linhagem A3.01)	19
4.4.Anticorpos.....	19
4.5.Ensaio de Fluorescência Bimolecular por Complementariedade (BiFC)	20
4.6.Imunofluorescência e microscopia confocal	21
4.7.Ensaio de degradação e <i>uptake</i> de EGF	21
4.8.Preparo do lisado total de proteínas e quantificação	22
4.9.SDS-Page e eletrotransferência.....	22
4.10. Imunodeteção em membrana de nitrocelulose	23
4.11. Purificação de EVs e preparação do lisado total	23
4.12. Análise dos dados	24
5. RESULTADOS	26
5.1.A expressão da subunidade $\gamma 2$ de AP1 é necessária para a eficiente degradação do complexo EGF-EGFR.....	26
5.1.1. O silenciamento da subunidade $\gamma 2$ de AP1 prejudica a degradação de EGF internalizado	
26	
.....	29

5.1.2. A degradação lisossomal de EGFR ativado requer a participação da subunidade $\gamma 2$ de AP1	29
5.1.3 A degradação de EGFR presente na superfície celular depende da participação da subunidade $\gamma 2$ de AP1	31
5.2. A proteína Alix participa do processo de liberação de Nef do HIV-1 em vesículas extracelulares (EVs)	32
5.2.1. A redução na expressão de Alix resulta na diminuição dos níveis de Nef secretado em EVs	33
5.2.2. Padronização do isolamento de EVs por ultracentrifugação	34
5.2.3. Padronização do KD de Alix por transdução viral em linfócitos T CD4 ⁺	35
5.2.4. Alix é importante para a secreção de Nef em EVs provenientes de linfócitos T CD4 ⁺	36
5.2.5. A interação de Alix e Nef ocorre em regiões contendo Rab27a e CD63	37
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO	56
APÊNDICE	78

--- *Introdução*

1. INTRODUÇÃO

Os corpos multivesiculares (MVBs) são estruturas endossomais singulares que permitem a formação de vesículas intralumenais (ILVs) facilitando o processo de degradação de proteínas transmembrana ao se fundir com lisossomos (Henne, Buchkovich and Emr 2011). A formação das ILVs é dependente da ação de proteínas da maquinaria ESCRT, que participam da deformação da membrana em direção ao lúmen do endossomo e da liberação da vesícula no interior do mesmo (Henne et al. 2011). Contudo, é importante destacar que os MVBs também são determinantes no processo de liberação de vesículas extracelulares (EVs). De forma alternativa à via de degradação, os MVBs podem se fundir com a membrana plasmática e liberar suas ILVs no meio extracelular (Johnstone et al. 1991). Antes pensava-se na liberação de EVs como um mecanismo utilizado para descartar componentes celulares não funcionais. No entanto, aumentaram as evidências que implicam as EVs como elementos chave na comunicação intercelular. A partir da liberação das ILVs no meio extracelular estas passam a ser denominadas como exossomos, um subtipo de EVs, e desempenham papéis importantes na comunicação intercelular, por meio do transporte de proteínas, mRNAs e miRNAs para células receptoras (Colombo, Raposo and Théry 2014).

O tráfego de proteínas nas células é finamente regulado por diversos fatores que reconhecem e direcionam proteínas para distintos compartimentos. Entre esses fatores, a família de proteínas adaptadoras (APs) desempenham um papel importante no processo de reconhecimento de cargas proteicas que são direcionadas para os diversos compartimentos das vias secretória e endocítica (Robinson 2015, Bonifacino 2014). A família dos APs em animais é formada por cinco membros (AP1, AP2, AP3, AP4 e AP5). Cada um dos membros é constituído por quatro subunidades distintas (heterotetrâmeros) e participam dos processos de endocitose e direcionamento de proteínas a partir do TGN e endossomos (Robinson 2015, Bonifacino 2014). Uma das vias com importante participação dos APs é a via de degradação lisossomal de proteínas endocitadas. Nesta via, proteínas alvo são endocitadas, direcionadas para MVBs e posteriormente degradadas em lisossomos. Apesar do papel dos APs no transporte de proteínas ser bem conhecido, algumas das subunidades destes complexos possuem isoformas expressas de forma ubíqua em células humanas (Boehm and Bonifacino 2002) e com potencial de formar complexos funcionalmente distintos. Entretanto, existem poucos estudos na literatura a respeito das possíveis diferenças funcionais dos APs, conferidas pelas diferentes isoformas de suas subunidades.

Este trabalho visou inicialmente analisar se as duas isoformas da subunidade γ do complexo AP1 conferem funções distintas a este complexo. A função de AP1 tem sido estudada no contexto do complexo contendo a isoforma $\gamma 1$ (Robinson 2015, Bonifacino 2014) e alguns estudos funcionais indicam que $\gamma 2$ pode ter uma função diferente (Döring et al. 2010, Rost, Döring and Prange 2008, Rost et al. 2006). Em paralelo aos estudos realizados para elucidar a participação de AP1 $\gamma 2$ na via canônica de degradação, mediada pelos MVBs, também foi estudada a via dos MVBs que se fusionam com a membrana plasmática para liberação de EVs. Para tal, foi analisado a importância de Alix nessa via. Alix é uma proteína acessória da maquinaria ESCRT, associada a formação das ILVs e seleção de carga a ser internalizada (Bissig and Gruenberg 2014). Portanto, nesse trabalho foi analisado o papel de Alix no direcionamento de Nef do HIV-1 para os MVBs que se fundem à membrana plasmática para a liberação de EVs.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. As proteínas adaptadoras regulam o transporte de diversas proteínas carga no sistema de endomembranas da célula

A evolução da compartimentalização intracelular em células eucarióticas levou ao surgimento de diversas organelas com funções especializadas e, consequentemente, à evolução de fatores que realizam a comunicação entre esses compartimentos (Dacks and Field 2007). Pois, a partir da existência de compartimentos intracelulares surge a importância do correto direcionamento de proteínas para compartimentos alvos, como por exemplo, o correto envio de hidrolases para os lisossomos. O deslocamento de proteínas específicas entre os compartimentos do sistema de endomembranas requer seu transporte no interior de vesículas que trafegam de forma específica (Dacks and Field 2007). Grupos específicos de moléculas participam da seleção de carga em vesículas que brotam de compartimentos doadores, com destino determinado no interior da célula (Robinson 2015). A formação das vesículas requer a participação de proteínas de revestimento que irão deformar a membrana do compartimento doador e tracionar a formação da vesícula para sua liberação no citoplasma. Dentre as proteínas de revestimento vesicular, clatrina destaca-se por sua participação no transporte anterógrado e retrógrado de proteínas a partir do complexo de Golgi, endossomos e da membrana plasmática. Assim, clatrina regula o transporte de diversos receptores e proteínas de superfície e até mesmo patógenos (Robinson and Pimpl 2014). Contudo, clatrina não age selecionando as proteínas que serão transportadas, sendo este papel atribuído às proteínas adaptadoras.

As moléculas adaptadoras se ligam em sequências sinais contidas na cauda citosólica de proteínas transmembrana e ao mesmo tempo funcionam como âncoras que irão permitir o recrutamento de clatrina, seguido da formação e liberação da vesícula (Robinson 2015). O reconhecimento das proteínas transportadas nas vias secretórias e endocíticas é principalmente mediado por uma família de proteínas adaptadoras (APs) (Robinson 2015, Bonifacino 2014). Em mamíferos, foram descritos cinco APs que regulam o transporte de proteínas em diversas vias de transporte, AP1, AP2, AP3, AP4 e AP5. O complexo AP1 é importante no tráfego de proteínas entre a rede-trans-Golgi (TGN) e endossomos e participa do direcionamento polarizado de proteínas em células epiteliais e nervosas. AP2 é responsável pela endocitose mediada por clatrina a partir da membrana plasmática. AP3 está envolvido no direcionamento de proteínas a partir de endossomos em direção aos lisossomos. O complexo AP4 atua em rotas

de direcionamento a partir do TGN em direção a superfície celular ou para endossomos, além de participar do direcionamento polarizado em células nervosas. AP5 tem sua função associada ao direcionamento de proteínas a partir de endossomos tardios, mas o compartimento alvo ainda não foi identificado (Robinson 2015, Bonifacino 2014) (Fig. 1).

Figura 1: Complexos APs e suas vias de tráfego.

O esquema representa a estrutura e as vias clássicas de funcionamento dos componentes da família de proteínas adaptadoras, os heterotetrâmeros AP1 à AP5 e suas subunidades. Cada complexo AP é formado por duas subunidades grandes (γ e $\beta 1$ em AP1, sendo a subunidade γ homóloga às subunidades α , δ , ϵ e ζ de AP2, AP3, AP4 e AP5, respectivamente). E a subunidade $\beta 1$ homóloga a $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 5$ de AP2, AP3, AP4 e AP5, respectivamente. Os APs são formados ainda por uma subunidade média ($\mu 1$, $\mu 2$, $\mu 3$, $\mu 4$ e $\mu 5$ em AP1 a AP5, respectivamente) e uma subunidade pequena ($\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$, $\sigma 4$ e $\sigma 5$ em AP1 a AP5) (Hirst et al. 2011, Boehm & Bonifacino 2001). Os complexos adaptadores AP1, AP2 e AP3 apresentam distintas isoformas descritas de suas subunidades codificadas por diferentes genes. AP1 possui isoformas da subunidade γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), da subunidade $\mu 1$ ($\mu 1A$ e $\mu 1B$) e da subunidade $\sigma 1$ ($\sigma 1A$, $\sigma 1B$ e $\sigma 1C$). AP2 apresenta isoformas somente da subunidade α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e AP3 das subunidades $\beta 3$ ($\beta 3A$ e $\beta 3B$), $\mu 3$ ($\mu 3A$ e $\mu 3B$) e $\sigma 3$ ($\sigma 3A$ e $\sigma 3B$) (Robinson et al. 2004, Boehm and Bonifacino 2002). Fonte: Esquema modificado de Hirst et al. (2011) e Hirst et al. (2014).

Cada complexo AP é um heterotetrâmero, ou seja, cada complexo é formado por quatro subunidades distintas. Eles são constituídos por duas subunidades grandes de aproximadamente 100 kDa, as subunidades γ e $\beta 1$ no complexo AP1, sendo a subunidade γ homóloga às subunidades α , δ , ϵ e ζ de AP2, AP3, AP4 e AP5, respectivamente, e a subunidade $\beta 1$ homóloga às subunidades $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ e $\beta 5$ de AP2, AP3, AP4 e AP5, respectivamente. Também possuem uma subunidade média de aproximadamente 50 kDa ($\mu 1$, $\mu 2$, $\mu 3$, $\mu 4$ e $\mu 5$ em AP1 a AP5, respectivamente) e uma subunidade pequena de aproximadamente 20 kDa ($\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$, $\sigma 4$ e $\sigma 5$ em AP1 a AP5) (Paczkowski, Richardson and Fromme 2015, Robinson 2015) (Fig. 1). É importante ressaltar que cada uma das subunidades tem importantes funções moleculares que

determinam quais proteínas serão reconhecidas pelo adaptador, quais as organelas de reconhecimento e direcionamento e quais componentes da maquinaria de tráfego irão se associar ao adaptador. AP1, AP2 e AP3 são potencialmente mais heterogêneos devido à existência de isoformas múltiplas das subunidades codificadas por diferentes genes, sendo descrito para AP1 duas subunidades γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), duas $\mu 1$ ($\mu 1A$ e $\mu 1B$) e três $\sigma 1$ ($\sigma 1A$, $\sigma 1B$ e $\sigma 1C$); para AP2 duas α ($\alpha 1$ e $\alpha 2$); e AP3 possui duas isoformas da subunidade $\beta 3$ ($\beta 3A$ e $\beta 3B$), duas $\mu 3$ ($\mu 3A$ e $\mu 3B$) e duas $\sigma 3$ ($\sigma 3A$ e $\sigma 3B$) (Boehm and Bonifacino 2002) (Fig. 1). Entretanto, poucos estudos funcionais foram realizados a fim de determinar se as diferentes isoformas possuem funções distintas entre si e se formam complexos adaptadores funcionais.

2.2. O complexo AP1 e suas vias clássicas de transporte

O complexo AP1 tem sua expressão ubíqua nas células humanas e é classicamente reconhecido pela sua importância no transporte de proteínas entre TGN e endossomos (Fig. 1, destacado em vermelho), processo que ocorre por meio da formação de vesículas revestidas por clatrina (Bonifacino 2014). A diversidade de isoformas existentes para as subunidades de AP1 pode potencialmente gerar complexos com funções distintas. De fato, foi demonstrado que AP1 pode ser complexado contendo as isoformas $\mu 1A$ ou $\mu 1B$, o que permite o reconhecimento de um maior número de proteínas carga que serão transportadas (Guo et al. 2013, Fölsch et al. 2001). As isoformas $\sigma 1$ também possuem funções distintas descritas. A isoforma $\sigma 1B$ é importante para o transporte da proteína sortilina e a regulação da adipogênese (Baltes et al. 2014). Por outro lado, a isoforma $\sigma 1C$ é necessária para a eficiente produção de partículas infecciosas do vírus da Hepatite C de forma dependente da interação de $\sigma 1C$ com a proteína estrutural E2 do vírus (Li et al. 2016).

Existem evidências de que as isoformas $\gamma 1$ e $\gamma 2$ também realizem atividades funcionais distintas. O complexo $\gamma 1$ associado a AP1 é o mais extensivamente estudado, e o modelo funcional de AP1 no transporte de cargas entre TGN e endossomos refere-se a AP1 contendo $\gamma 1$ (Robinson 2015, Bonifacino 2014). Alguns trabalhos sugerem que $\gamma 2$ tem participação no processo de maturação de endossomos para lisossomos e direcionamento de cargas para degradação (Döring et al. 2010, Rost et al. 2008, Rost et al. 2006).

2.3. O receptor de EGF como ferramenta para o estudo de vias canônicas do tráfego

O *epidermal growth factor receptor* (EGFR) é amplamente utilizado como modelo para estudos de tráfego intracelular de receptores de sinalização (Ceresa and Peterson 2014). EGFR é um importante receptor presente em células epiteliais que se liga a fatores de crescimento e controla diferentes funções biológicas como migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Ceresa and Peterson 2014). O EGFR recém-sintetizado é direcionado para a membrana plasmática a partir do TGN. Ao se associar ao ligante, EGF, ele é rapidamente endocitado em vesículas revestidas por clatrina. O receptor internalizado é então entregue a endossomos iniciais e posteriormente aos MVBs (von Zastrow and Sorkin 2007, Felder et al. 1990). Todos os processos que regulam o transporte de EGFR, a partir da membrana plasmática até sua degradação, tem sido extensivamente estudados, como os motivos presentes na cauda citosólica de EGFR ou mesmo os processos de ubiquitinação do receptor (von Zastrow and Sorkin 2007, Felder et al. 1990). Estes fatos tornam a via de degradação canônica de EGFR, após ativação com EGF, uma poderosa ferramenta para o estudo da via de degradação lisossomal a partir da membrana plasmática.

2.4. Direcionamento dos MVBs para degradação lisossomal e para liberação de EVs

Os MVBs são caracterizados pela presença de ILVs que se formam por meio de invaginações da membrana limitante (Klumperman and Raposo 2014). O mecanismo molecular envolvido na formação de ILVs tem sido extensivamente estudado e será descrito no próximo item. De forma alternativa à fusão com lisossomos, os MVBs podem se fundir com a membrana plasmática e liberar as ILVs para o meio extracelular, como EVs (Colombo et al. 2014). Ainda não está claro se os MVBs destinados a degradação ou fusão com a membrana plasmática são formados de formas distintas ou se o seu destino é regulado após sua completa formação, dependente de sinais de tráfego na célula (daSilva-Januário et al. 2016).

Algumas evidências indicam que o direcionamento dos MVBs para fusão com a membrana plasmática tem a participação das proteínas da família Rab (Ostrowski et al. 2010). As proteínas Rab são GTPases que estão envolvidas em diferentes etapas do tráfego de vesículas, participando da formação, ancoramento e fusão de vesículas com a membrana alvo (Zerial and McBride 2001). Ostrowski e colaboradores (2010) demonstraram que a redução da expressão de cinco proteínas da família Rab (Rab2b, Rab9a, Rab5a, Rab27a e Rab27b) tem o efeito de inibir a liberação de EVs, sem produzir impacto na secreção de proteínas solúveis na

via secretória constitutiva. O papel de Rab27a e Rab27b foi estudado em maiores detalhes pelos autores e foi observado que ambas desempenham papel importante no ancoramento dos MVBs com a membrana plasmática e liberação das EVs (Ostrowski et al. 2010). Muitos estudos ainda são necessários para compreender a bifurcação no destino dos MVBs na célula e quais os mecanismos envolvidos em cada um dos casos.

2.5. A maquinaria ESCRT

As deformações na membrana do endossomo gerando ILVs requerem a ação de um importante complexo proteico que é responsável pelo remodelamento da membrana, sua invaginação e liberação no lúmen dos MVBs (Henne et al. 2011). Esta função é realizada pelos *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRTs) e suas proteínas acessórias. A maquinaria ESCRT está associada a funções importantes na célula que dependem de deformações na membrana para ocorrerem. Os ESCRTs participam da formação das ILVs dos MVBs e selecionam as cargas que serão internalizadas nestas vesículas (Katzmann, Odorizzi and Emr 2002), bem como, o brotamento de diversos vírus envelopados (Morita and Sundquist 2004). Os ESCRTs também realizam a cisão da membrana plasmática nos estágios finais da citocinese (Carlton and Martin-Serrano 2007, Morita et al. 2007b), estão envolvidos no reparo da membrana plasmática (Jimenez et al. 2014), reparo e remontagem do envelope nuclear (Raab et al. 2016, Olmos et al. 2015) e na biogênese de EVs (Henne et al. 2011). É importante ressaltar que a maquinaria ESCRT tem sua ação diferente daquela mediada por clatrina e dinamina. A maquinaria ESCRT realiza o processo de invaginação da membrana em direção ao lúmen da organela ou a região extracelular na membrana plasmática, enquanto que clatrina e dinamina realizam o processo de deformação e liberação da membrana em direção ao citosol da célula (Kirchhausen, Owen and Harrison 2014, Henne et al. 2011).

A maquinaria ESCRT é composta por quatro complexos que são denominados ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II e ESCRT-III. Associadas a esta maquinaria estão proteínas acessórias importantes no processo de seleção de cargas que serão enviadas para as ILVs e na fissão da membrana, respectivamente, as proteínas Alix e a AAA ATPase VPS4 (Carlson and Hurley 2012, Henne et al. 2011). A maquinaria ESCRT é recrutada de forma sequencial para a membrana dos endossomos onde realiza a deformação da membrana e concentração das proteínas que serão endereçadas para o interior dos MVBs (Carlson and Hurley 2012, Henne et al. 2011).

O reconhecimento de proteínas direcionadas para as ILVs dos MVBs, de forma dependente da maquinaria ESCRT, é geralmente realizado por meio do reconhecimento de ubiquitinação (Henne et al. 2011). De forma resumida, o reconhecimento da ubiquitinação é iniciado por ESCRT-0 que está associado à membrana de endossomos iniciais. ESCRT-0 recruta então ESCRT-I e ESCRT-II e inicia o processo de invaginação da membrana endossomal e concentração das proteínas carga na membrana em deformação. ESCRT-III é então recrutado para a membrana endossomal onde irá auxiliar no processo de formação da ILV. A AAA ATPase VPS4 catalisa o processo de dissociação dos complexos ESCRT da membrana permitindo que sua ação seja cíclica (Henne et al. 2011) (Fig. 2).

A seleção de cargas ubiquitinadas se inicia nos subdomínios dos endossomos iniciais enriquecidos com o complexo ESCRT-0 (Raiborg and Stenmark 2002). ESCRT-0 é composto por duas subunidades, HRS (*hepatocyte grown fator-regulated tyrosine kinase substrate*) e STAM (*signal transducing adaptor molecule*) (Henne et al. 2011) (Fig. 2). A capacidade de ESCRT-0 de interagir com a ubiquitina presente na cauda citoplasmática de proteínas de membrana, inicia a via canônica de degradação dessas proteínas mediada pelos ESCRTs (Henne et al. 2011). Foi proposto que o recrutamento de ESCRT-I para a membrana do endossomo é facilitado por ESCRT-0 (Lu et al. 2003), pois ESCRT-I adere fracamente à membranas (Kostelansky et al. 2007). ESCRT-I foi o primeiro complexo ESCRT a ser descrito e é composto por quatro proteínas: TSG101, VPS28, VPS37 e MVB12 (Morita et al. 2007a, Bache et al. 2003, Eastman et al. 2005, Stuchell et al. 2004, Bishop and Woodman 2001) (Fig. 2). ESCRT-I liga-se tanto ao ESCRT-0 quanto à carga ubiquitinada, o que sugere que este funcione como um adicional sistema de seleção de carga, ESCRT-I também interage com ESCRT-II (Babst 2011). ESCRT-II é um heterotetrâmero em forma de Y que consiste em uma subunidade de VPS22 e VPS36, e duas subunidades de VPS25 (Langelier et al. 2006, Babst et al. 2002) (Fig. 2). A interação de ESCRT-I com ESCRT-II inicia o recrutamento e montagem do complexo ESCRT-III que se agrega na membrana endossomal, facilitando a invaginação da membrana e formação das ILVs contendo a carga que foi concentrada. ESCRT-III é composto de quatro subunidades principais que são denominadas nos mamíferos como: CHMPs6, 4, 3 e 2 (*charged multivesicular body proteins*) (Christ et al. 2017) (Fig. 2). A etapa final de formação das ILVs nos MVBs requer a ação do complexo VPS4, uma AAA ATPase que dissocia ESCRT-III dos MVBs. Essa etapa é essencial para a reciclagem da maquinaria ESCRT e também pode estar envolvida na fissão das ILVs (Babst 2011). Dessa forma, pode-se resumir o funcionamento da maquinaria ESCRT em três processos distintos, mas interligados.

Primeiramente ocorre o reconhecimento de cargas ubiquitinadas impedindo a reciclagem das mesmas de volta à membrana plasmática. Após o reconhecimento ocorre a deformação da membrana endossomal e posterior fissão das invaginações, formando as ILVs (Christ et al. 2017) (Fig. 2).

Figura 2: A maquinaria ESCRT e proteínas acessórias na formação de ILVs.

Os complexos de proteínas da maquinaria ESCRT requerido para formação dos MVBs, medeiam a concentração de carga, formação ILVs e são recrutados do citoplasma para a membrana de endossomos tardios de maneira sequencial. A maquinaria ESCRT é constituída por quatro complexos, ESCRT-0 (HRS e STAM), ESCRT-I (TSG101, VPS28, VPS37 e MBV12), ESCRT-II (VPS22, VPS36 e duas subunidades VPS25) e ESCRT-III (CHMP6, CHMP4, CHMP3 e CHMP2) e proteínas associadas, tais como VPS4 e Alix. ESCRT-0 é responsável pelo reconhecimento de proteínas carga ubiquitinadas e recrutamento de ESCRT-I. O complexo ESCRT-I é responsável pela triagem da carga e interage com ESCRT-II. Como ESCRT-I, ESCRT-II classifica a carga e a transfere para complexos ESCRT-III em um mecanismo que depende da interação entre os dois complexos. ESCRT-III por sua vez forma um filamento responsável pela deformação da membrana do endossomo, que leva a formação das ILVs e concentração da carga no interior das mesmas. ESCRT-III recruta a AAA ATPase VPS4 que catalisa a desmontagem dos complexos, etapa essencial para a dissociação e reciclagem da maquinaria ESCRT e também pode estar envolvida na fissão das ILVs (Basbt 2011). Alix é uma proteína acessória da maquinaria ESCRT capaz de interagir com ESCRT-I e ESCRT-III e que tem uma participação importante na seleção de carga para as ILVs (Friand, David and Zimmermann 2015, Bissig and Gruenberg 2014). Fonte: Esquema modificado de daSilva-Januário et al. (2016).

2.6. A proteína acessória Alix e seu papel no recrutamento de cargas para os MVBs

Alix participa ativamente da seleção de cargas que serão enviadas para os MVBs auxiliando a ação da maquinaria ESCRT (Bissig and Gruenberg 2014). Alix é composta por três domínios estruturais: o domínio BroI; um domínio em forma de V (VD) e um domínio C-

terminal rico em prolina (PRD). Tais domínios permitem que Alix tenha uma diversa rede de interações (Bissig and Gruenberg 2014). Através de sua interação com subunidades dos complexos ESCRT-I e ESCRT-III (subunidades TSG101 e CHMP4A, respectivamente), Alix reconhece e interage com proteínas alvo ou diretamente com moléculas de ubiquitina ligadas às proteínas alvo que serão enviadas para os MVBs (Bissig and Gruenberg 2014). O reconhecimento de proteínas não ubiquitinadas por Alix ocorre através dos domínios YPXnL (onde Xn pode variar em sequência e tamanho) ou através de outros domínios não clássicos (Zhai et al. 2008, Zhai et al. 2011). Algumas destas proteínas são: o receptor acoplado a proteína G, PAR1 (Dores et al. 2012), a proteína p9 do vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) e a proteína p6 do HIV-1 (Strack et al. 2003). Este reconhecimento independente de ubiquitinação exemplifica o papel auxiliar de Alix no reconhecimento de cargas para a maquinaria ESCRT.

Figura 3: O complexo SDC-sintenina-Alix na biogênese das EVs.

Representação esquemática da interação entre SDC, sintenina e Alix durante a formação das ILVs que serão liberadas como EVs, por meio da fusão do MVB com a membrana plasmática. Através dessa interação, Alix é direcionado a ILVs e pode recrutar cargas de uma forma alternativa ao recrutamento mediado por Alix em sua atuação com a maquinaria ESCRT (Friand, David and Zimmermann 2015). Fonte: Esquema modificado de daSilva-Januário et al. (2016).

Apesar de seu papel evidente na seleção de cargas para entrega nos MVBs seguida da degradação da proteína alvo, Alix tem se mostrado importante no processo de seleção de cargas que serão liberadas em EVs provenientes dos MVBs (Baietti et al. 2012). Foi demonstrado que

a incorporação de Alix em ILVs para secreção como EVs é dependente de sua interação com o domínio N-terminal da proteína sintenina (Baietti et al. 2012). Sintenina, por sua vez, interage com sindecan (SDC), por meio de seu domínio PDZ, o qual também é responsável pela localização de sintenina em membranas (Zimmermann et al. 2001, Grootjans et al. 2000). SDC-sintenina-Alix formam um complexo triparte que atua na formação de ILVs e que pode participar da seleção de cargas para as ILVs (Friand, David and Zimmermann 2015) (Fig. 3). Por meio desse complexo podem ser selecionadas cargas que serão incorporadas nas ILVs e liberadas em EVs. Apesar destes fatos conhecidos, ainda não se sabe como (e se) Alix regula o destino de proteínas carga nos MVBs para serem degradadas nos lisossomos ou serem liberadas em EVs.

2.7. EVs contendo Nef desempenham um papel importante na patogenicidade do HIV-1

Nef é uma proteína acessória do HIV que altera vias de transdução de sinal e o transporte intracelular de proteínas importantes para o funcionamento do sistema imunológico, favorecendo a replicação do HIV e progressão à AIDS (Foster and Garcia 2008, Lindwasser, Chaudhuri and Bonifacino 2007). Nef desempenha estas funções interagindo com fatores regulatórios do tráfego de proteínas (Roeth and Collins 2006). Dentre as diversas funções atribuídas a Nef, a que mais a caracteriza é a capacidade de induzir a regulação negativa de proteínas expressas na membrana plasmática das células infectadas, como o receptor CD4 (Pereira and daSilva 2016). Nef interage com a cauda citosólica de CD4 e recruta o complexo adaptador AP2. A formação do complexo CD4/Nef/AP2 leva à indução da endocitose de CD4 em vesículas revestidas por clatrina (Burtey et al. 2007, Chaudhuri et al. 2007). Uma vez internalizado, este complexo é dirigido aos MVBs que posteriormente irão se fundir aos lisossomos levando a degradação do CD4 (daSilva et al. 2009). Foi demonstrado que o direcionamento de CD4 aos MVBs induzido por Nef é independente de ubiquitinação (daSilva et al. 2009), mas ocorre de forma dependente da interação de Nef com Alix (Amorim et al. 2014).

Nef promove alterações na morfologia endossomal (Madrid et al. 2005) e leva a um aumento no número de MVBs (Costa et al. 2006, Stumptner-Cuvelette et al. 2003) e lisossomos (Sanfridson, Hester and Doyle 1997). Sabe-se também que Nef secretado por meio das EVs pode levar a apoptose de células T CD4⁺ receptoras destas vesículas contendo Nef, independente da infecção pelo HIV (Lenassi et al. 2010). Nef ainda é capaz de modular as quantidades de CD4, e de moléculas de MHC-I, secretadas em EVs (de Carvalho et al. 2014). Esta ação de Nef

leva a uma ineficiência na prevenção da infecção pelo HIV, pois EVs CD4-positivas inibem fortemente a infecção pelo HIV *in vitro* (de Carvalho et al. 2014). Estes dados juntos mostram a importância funcional de Nef secretado em EVs.

As evidências sobre a ação de Alix na seleção de proteínas para as ILVs o tornam um potencial adaptador para seleção de carga em MVBs que serão levados para à degradação em lisossomos. No entanto, Alix também poderia atuar como um adaptador quando é internalizado nas ILVs que serão secretadas como EVs, por meio da sua interação com sintenina-SDC (Baietti et al. 2012). Neste mecanismo, a função de Alix seria de internalizar moléculas nos MVBs que serão direcionadas a membrana plasmática para liberação das ILVs como EVs. Baseado neste modelo, uma pergunta importante que surge é se a interação de Nef e Alix é importante para o envio de Nef para ILVs em MVBs, que serão direcionados à membrana plasmática, para liberação de EVs.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar o papel de AP1 γ 2 e Alix no direcionamento de proteínas em vias de degradação em lisossomos e liberação em EVs, mediadas pelos MVBs.

3.2. Objetivos Específicos

Entender o envolvimento da subunidade γ 2 de AP1 no processo de degradação do complexo EGF-EGFR na via clássica dos MVBs.

Compreender as diferenças funcionais entre as subunidades γ 1 e γ 2 de AP1 no processo de degradação do complexo EGF-EGFR na via clássica dos MVBs.

Verificar se a secreção de Nef em EVs depende da participação da proteína acessória Alix em células HeLa e em linfócitos T CD4⁺.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

Células aderentes e semiaderentes foram cultivadas em meio DMEM-*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e mantidas em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Células HeLa CCL2 (ATCC-*American Type Culture Collection*, Manassas, VA) foram obtidas comercialmente e as células semiaderentes Peak (HEK-293), transfectadas estavelmente com antígeno T do vírus SV-40 (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Reuben Siraganian (NIH, Bethesda, MD). Quando as células atingiam 90% de confluência, elas eram removidas dos frascos de cultivo utilizando Tripsina-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) por 5 minutos em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ à 37 °C e em seguida, ressuspensas em meio de cultura para posterior quantificação e padronização do número de células. As células T CD4⁺ (A3.01), derivadas da linhagem celular CEM, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Juan Bonifacino (NIH, Bethesda, MD) e utilizadas para geração das linhagens A3.01 GFP e A3.01 Nef/GFP (de Carvalho et al. 2014). Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e mantidas em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Os linfócitos foram subcultivados antes de atingirem a concentração de 1x10⁶ células/mL. Foi utilizado um microscópio invertido Nikon TMS para monitoramento celular.

4.2. Transfecções e RNA de interferência

Os siRNAs desenhados para silenciar $\gamma 1$ (5'-GGAAGAGCCUAUUCA GGUA-3'), $\gamma 2$ (5'-AAACCCUGCUUUGCUGUUA-3') e Alix (5'-GCAGUAAUAUGU CUGCUC-3') foram obtidos comercialmente (Dharmacon, Lafayette, CO). Foi utilizado um siRNA controle universal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Células HeLa foram submetidas a dois *rounds* de transfecção com siRNA para $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ com um intervalo de 48 horas e a um *round* de transfecção com siRNA para Alix. As transfecções de siRNA foram realizadas com o reagente oligofectamina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), seguindo as instruções do fabricante. No quarto dia após a transfecção de siRNA (para $\gamma 1$ ou $\gamma 2$) as células foram

utilizadas para experimentos de biotinylation e *uptake* de EGF. No segundo dia após a transfecção de siRNA (para Alix) as células foram transfectadas com plasmídeos codificando Nef *wild-type* (wt) e submetidas a produção de EVs para posterior análise. Células HeLa foram submetidas a transfecção de plasmídeos codificando as proteínas Nef e Alix fusionadas aos resíduos 1-158 e 159-239, respectivamente, da proteína Venus (Nef-VNt e VCt-Alix) e também cotransfectadas com plasmídeo codificando mCherry-Rab5 Q71L e DsRed-Rab27a (gentilmente cedido pela Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico). As transfecções de DNA foram realizadas com o reagente lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), seguindo as instruções do fabricante.

4.3. Montagem e produção dos retrovírus para transdução de linfócitos (linhagem A3.01)

Os vetores lentivirais foram produzidos em células Peak cotransfectadas com plasmídeos contendo elementos empacotadores (psPax2 e pMD2G) e o plasmídeo pLKO contendo o cDNA que codifica um shRNA específico para Alix ou o plasmídeo vazio, obtidos comercialmente (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). O sobrenadante contendo os vírus foi coletado após dois dias de transfecção e utilizado para transdução de linfócitos. As células A3.01 ($2,0 \times 10^5$ células/mL) foram incubadas com o sobrenadante contendo os vírus PLKO vazio ou PLKO shAlix por 24 horas. Após este período, as células transduzidas foram lavadas com PBS e cultivadas por 6 dias na presença da droga puromicina ($1 \mu\text{M}$) para seleção das células transduzidas. A eficiência do silenciamento foi avaliada por *immunoblotting* ao longo do tempo de incubação com a droga (3 e 6 dias). Após esse período as células foram preparadas para produção de EVs. Os experimentos de produção dos retrovírus foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Eurico Arruda.

4.4. Anticorpos

Os anticorpos utilizados para as técnicas de *immunoblotting* e imunofluorescência estão descritos na tabela abaixo, assim como seus respectivos fabricantes.

Tabela 1: Anticorpos

Immunoblotting

CD63 _____ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

Nef _____ NIH AIDS Reagent Program (Bethesda, MD)
 Nef _____ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
 Alix (N-20) _____ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
 GFP _____ Doação (R. Hedge, MRC, Cambridge, UK)
 EEA1 _____ BD Biosciences (San Jose, CA)
 β -actina _____ Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
 γ 1 _____ BD Biosciences (San Jose, CA)
 γ 2 _____ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
 EGFR _____ Abcam (Cambridge, UK)
 Anti-IgG de camundongo HRP _____ GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
 Anti-IgG de coelho HRP _____ GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
 Anti-IgG de cabra HRP _____ Jackson Immuno Research Labs (West Grove, PA)

Imunofluorescência

γ 1 _____ BD Biosciences (San Jose, CA)
 γ 2 _____ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
 CD63 _____ BD Biosciences (San Jose, CA)
 EEA1 _____ BD Biosciences (San Jose, CA)
 Anti-IgG de camundongo Alexa 594 _____ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
 Anti-IgG de coelho Alexa 594 _____ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

4.5. Ensaio de Fluorescência Bimolecular por Complementariedade (BiFC)

Foram realizados ensaios de Fluorescência Bimolecular por Complementariedade (BiFC) em células HeLa CCL2. Para o ensaio do BiFC foi utilizado o plasmídeo pcDNA3.1ZEO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) contendo as sequências codificadoras de interesse em fusão com o domínio N ou C terminal da proteína fluorescente Venus, com expressão sob o controle do promotor CMV. As construções utilizadas foram: Nef fusionado aos resíduos 1-158 da proteína Venus (Nef-VNt) e Alix fusionada aos resíduos 159-239 de Venus (VCt-Alix) (Amorim et al. 2014). No ensaio do BiFC as proteínas de interesse são traduzidas em fusão com o domínio N ou C terminal da proteína Venus, uma variante da proteína de fluorescência amarela YFP. Se ocorrer interação entre as proteínas de interesse a aproximação entre os domínios da proteína Venus é suficiente para a reconstituição de sua

fluorescência. As construções foram transfectadas, as células foram incubadas por 10 horas a 37 °C e preparadas para imunofluorescência.

4.6. Imunofluorescência e microscopia confocal

As células HeLa CCL2 foram aderidas em lamínulas de vidro, fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) em PBS durante 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 0,01% de saponina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em solução de bloqueio (0,2% de gelatina porcina e 0,01% de saponina em PBS) por 30 minutos a 37 °C. Após o bloqueio as células foram incubadas com anticorpos primários e secundários em solução de bloqueio suplementada com 0,01% de saponina. Entre os anticorpos as células foram lavadas com PBS e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro (Knittel Glase, Bielefeld, NW) usando Fluormount G (EM Sciences, Hatfield, PA). As células foram visualizadas por meio de microscópio confocal Zeiss LSM 780 disponível no Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifoton (LMMM), pertencente ao departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP-USP, onde este projeto foi realizado.

4.7. Ensaio de degradação e *uptake* de EGF

Nos ensaios de imunofluorescência, células HeLa foram crescidas e transfectadas em lamínulas. No dia 4, após o tratamento com siRNA, as células foram lavadas com Opti-MEM (Thermo Scientific, Waltham, MA) e incubadas por 1 hora a 37 °C. As células foram estimuladas com EGF conjugado com Alexa-488 (Thermo Scientific, Waltham, MA) (100 ng/mL em Opti-MEM) por 5 minutos a 37 °C. Após lavagens com DMEM, as células foram incubadas por 30 e 120 minutos a 37 °C e então fixadas após cada tempo com PFA 4% em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Nos ensaios de *immunoblotting*, foi analisado a degradação de EGFR. As células em estado de *starvation* foram pré-incubadas por 30 minutos com 20 µg/mL de cicloheximida (CHX) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em Opti-MEM. As células foram então incubadas ou não com 50 ng/mL de EGF não marcado (Thermo Scientific, Waltham, MA) em Opti-MEM suplementado com CHX a 4 °C por 30 minutos, lavadas duas vezes com PBS gelado. Após as lavagens as células foram incubadas pelos tempos indicados a 37 °C ou, nos ensaios de biotilação, incubadas com 0,2 mg/mL de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific, Waltham, MA) em PBS gelado por 30 minutos a 4 °C. As células

foram lavadas novamente com PBS gelado por duas vezes e incubadas com 50 mM de NH_4Cl por 15 minutos a 4 °C e então lavadas com PBS gelado três vezes. Após as lavagens as células foram incubadas com meio completo DMEM (Thermo Scientific, Waltham, MA) a 37 °C, permitindo a internalização de proteínas biotiniladas nos tempos indicados. Após os tempos as células foram lavadas com PBS e incubadas com tampão de lise por 30 minutos a 4 °C. Os lisados foram centrifugados a 20.000xg por 15 minutos a 4 °C e os sobrenadantes recuperados. As amostras foram quantificadas usando o reagente BioRad Protein Assay (BioRad, Hercules, CA) e as amostras equalizadas e incubadas com 30 μl de Neutravidin Plus UltraLink Resin (Thermo Scientific, Waltham, MA), pré-lavada, por 3 horas em um orbital a 4 °C. Seguido de três lavagens com tampão de lise gelado, as proteínas foram eluídas das *beads* com tampão de amostra e analisadas por *immunoblotting*. O *input* representa 10% do total de proteínas incubadas com as *beads*.

4.8. Preparo do lisado total de proteínas e quantificação

A monocamada de células foi lavada duas vezes com PBS a 4 °C e as células solubilizadas pela adição de tampão de lise (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM EDTA), suplementado com inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e incubados por 30 minutos em gelo. Os lisados foram centrifugados por 15 minutos a 20.000xg. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada com o reagente BioRad Protein Assay (BioRad, Hercules, CA) a 595 nm em espectrofotômetro Evolution 60S (Thermo Scientific, Waltham, MA) e equalizadas. As amostras foram diluídas em igual volume e foi acrescentado tampão de amostra (4% SDS, 160 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glicerol, 100 mM DTT e 0.005% de azul de bromofenol). As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 95 °C e analisadas por *immunoblotting*.

4.9. SDS-Page e eletrotransferência

Proteínas dos extratos celulares totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Bio-Rad, Hercules, CA) com corrente constante de aproximadamente 90 volts. O gel contendo os perfis proteicos foi equilibrado em tampão para transferência (25 mM Tris e 190 mM Glicina em Metanol 10%). O suporte para transferência foi colocado dentro de uma cuba de transferência, de modo que a membrana de nitrocelulose (Millipore, Bedford, MA)

ficasse voltada para o polo positivo. A eletrotransferência foi realizada a 360 mA por 1 hora e 15 minutos. A eficiência da transferência foi avaliada por coloração com solução de Ponceau (Ponceau S 0,1% em ácido acético 5%).

4.10. Imunodeteção em membrana de nitrocelulose

As membranas de nitrocelulose contendo proteínas transferidas do gel foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,1% (PBS-T) e incubadas em solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado e 1% de BSA em PBS-T) por 1 hora sob agitação. As membranas foram lavadas 5 vezes (intervalos de 5 minutos entre lavagens) com PBS-T, incubadas com anticorpo primário *over-night* a 4 °C e lavadas como anteriormente com PBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário adequado conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) por 1 hora sob agitação. Após a incubação, as membranas foram lavadas novamente com PBS-T por 5 vezes de 5 minutos. Para detecção das proteínas utilizou-se solução de ECL com subsequente exposição das membranas e captação do sinal por luminômetro (Bio-Rad, Hercules, CA) acoplado ao sistema digital e software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA).

4.11. Purificação de EVs e preparação do lisado total

Para permitir uma análise comparativa, as EVs foram coletadas de uma mesma quantidade de sobrenadante condicionados com o mesmo número de células. Brevemente, os meios de cultura foram preparados usando soro fetal bovino depletado de EVs por ultracentrifugação a 140.000xg por 16 horas a 4 °C, em seguida filtrado através de um filtro de 0,22 µm. As células foram mantidas em cultura em meio completo livre de EVs por 72 horas e após esse período nos experimentos com células não aderentes as células foram peletadas por centrifugação a 100xg por 10 minutos, em seguida o sobrenadante resultante foi centrifugado a 2000xg por 10 minutos, passado por um filtro de 0,22 µm para remover debris celulares e o filtrado foi ultracentrifugado a 110.000xg por 1 hora e 10 minutos a 4 °C. O pellet contendo EVs foi submetido a uma lavagem com PBS por ultracentrifugação. O pellet resultante foi ressuspensionado em 50 µl de tampão de amostra. Nos experimentos com células aderentes, o sobrenadante foi centrifugado a 2000xg por 10 minutos, passado por um filtro de 0,22 µm para remover debris celulares e as EVs foram isoladas com o *Kit Total Exosome Isolation* (Thermo Scientific, Waltham, MA), seguindo as instruções do fabricante ou por ultracentrifugação como

citado anteriormente e os pellets foram solubilizados com 50 µl de tampão de amostra. Para análises no NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) (Malvern, Malvern, UK) o *pellet* resultante foi ressuspensionado em 50 µl de PBS filtrado com filtro de 0,22 µm a temperatura ambiente. Os pellets celulares foram lavados com PBS gelado e ressuspensionados em tampão de lise suplementado com inibidor de protease (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a 4 °C, preparados com tampão de amostra e fervidos por 5 minutos a 95 °C.

4.12. Análise dos dados

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo método ANOVA, *Unpaired t test* e *Paired t test* utilizando o *software* GraphPad Prism 5. O valor p de significância está representado por: * (p<0.05), ** (p<0.005) e *** (p<0.0005).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. A expressão da subunidade $\gamma 2$ de AP1 é necessária para a eficiente degradação do complexo EGF-EGFR

A caracterização da função de AP1 no transporte de cargas proteicas do sistema de endomembranas mostrou que AP1 está comumente envolvido no direcionamento de proteínas entre TGN e endossomos (Robinson 2015, Bonifacino 2014). No entanto, algumas das subunidades de AP1, assim como outros adaptadores da família, possuem isoformas codificadas por diferentes genes. Assim, existem duas isoformas da subunidade γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), duas isoformas da subunidade $\mu 1$ ($\mu 1A$ e $\mu 1B$) e três isoformas da subunidade $\sigma 1$ ($\sigma 1A$, $\sigma 1B$ e $\sigma 1C$) (Boehm and Bonifacino 2002) (Fig. 1). Estas possíveis variações na constituição do complexo AP1 poderiam levar a montagem de até doze heterotetrâmeros funcionalmente diferentes. Não existem muitas evidências, e poucos estudos foram realizados com o objetivo de fazer uma caracterização funcional de complexos APs montados com diferentes isoformas das subunidades.

Mattera et al. (2011) demonstram que a subunidade $\gamma 2$ é capaz de formar um complexo AP1 com as subunidades $\beta 1$, $\mu 1A$ e $\sigma 1A$, mas a funcionalidade deste complexo permaneceu desconhecida. Nosso grupo de pesquisa recentemente encontrou evidências de que as isoformas $\gamma 1$ e $\gamma 2$ de AP1 tem papéis distintos no processo de regulação negativa do receptor CD4 mediado pela proteína Nef do HIV-1. Nestes ensaios foi observado que a subunidade $\gamma 2$ de AP1 é essencial para o direcionamento de CD4 para os MVBs e subsequente degradação lisossomal de forma mediada por Nef, enquanto que a expressão de $\gamma 1$ é dispensável nesse processo (Tavares et al. 2017). Inicialmente objetivou-se neste trabalho analisar se a importância de $\gamma 2$ na via de degradação a partir da endocitose era específica para o efeito de Nef sobre CD4 ou se $\gamma 2$ está envolvido no processo canônico de regulação negativa de receptores de sinalização da superfície celular.

5.1.1. O silenciamento da subunidade $\gamma 2$ de AP1 prejudica a degradação de EGF internalizado

Para estudar a importância de $\gamma 2$ nos processos de degradação lisossomal de proteínas transmembrana, a partir da endocitose, foram realizados experimentos para visualizar a degradação do ligante de EGFR, EGF. A via de EGF-EGFR tem sido extensivamente estudada

como um protótipo do processo de regulação negativa de receptores de sinalização mediada por MVBs (von Zastrow and Sorkin 2007, Felder et al. 1990). Os receptores de EGF ao interagir com seus ligantes ativam cascatas de sinalização que desempenham diversas funções na célula (Ceresa and Peterson 2014), essa interação provoca a endocitose de complexos EGF-EGFR que são posteriormente ubiquitinados e degradados em lisossomos (von Zastrow and Sorkin 2007, Felder et al. 1990). A ubiquitinação atua como um sinal de direcionamento dos complexos para degradação lisossomal. Esses complexos são recrutados para regiões específicas da membrana de endossomos, que se invaginam em direção ao lúmen levando a formação de ILVs contendo EGF-EGFR (von Zastrow and Sorkin 2007, Felder et al. 1990). Esta via de degradação de EGF-EGFR também é conhecida como via canônica de degradação.

Para testar a importância de $\gamma 2$ no processo canônico de degradação de EGF-EGFR foram realizados ensaios de *uptake* de EGF fluorescente, conjugado com Alexa 488, comparando a cinética de degradação de EGF internalizado em células controle e em células silenciadas para as subunidades $\gamma 1$ ou $\gamma 2$ de AP1, por meio da transfecção de siRNAs específicos para essas moléculas. As amostras foram examinadas por microscópio confocal, seguido da análise da intensidade de fluorescência de EGF-Alexa 488. Observou-se que tanto em células controle (Fig. 4A e C) como em células silenciadas para $\gamma 1$ (Fig. 4B) a marcação de EGF foi drasticamente reduzida com 120 minutos de incubação, indicando a entrega dos complexos EGF-EGFR aos lisossomos e sua degradação. No entanto, em células silenciadas para $\gamma 2$, mesmo após 120 minutos de incubação ainda se observa a marcação de EGF-Alexa 488 (Fig. 4D). Estes dados indicam que $\gamma 2$, mas não $\gamma 1$, é necessário para a eficiente degradação de EGF em lisossomos. A análise estatística da intensidade de fluorescência de EGF-Alexa 488 mostrou uma diferença significativa nas células controle e silenciadas para $\gamma 1$ em comparação com as silenciadas para $\gamma 2$ (Fig. 4E). Também foi analisado a colocalização de EGF com as subunidades γ , utilizando o coeficiente de Mander's, onde 1 representa colocalização máxima e 0 nenhuma colocalização. Foi observado que EGF colocaliza de forma significativa com $\gamma 2$ (tM2) em comparação a $\gamma 1$ (tM2) (Fig. 4F). Juntos estes dados levantam a hipótese de que a subunidade $\gamma 2$ participa do processo de direcionamento de cargas endocitadas à via dos MVBs e a degradação lisossomal.

Figura 4: O silenciamento da subunidade $\gamma 2$ de AP1 prejudica a degradação de EGF.

Células HeLa foram silenciadas com siRNA para $\gamma 2$ (D) ou $\gamma 1$ (B) e células não tratadas com siRNA foram utilizadas como controle (A e C). Após o silenciamento as células foram incubadas com meio para transfecção (Opti-MEM) por 1 hora a 37 °C, em seguida foram incubadas com EGF conjugado com Alexa 488 (100 ng/mL em Opti-MEM) por 5 minutos, lavadas com DMEM e incubadas por 30 e 120 minutos a 37 °C. Após estes tempos as células foram fixadas, imunomarcadas com anticorpos anti- $\gamma 1$ ou anti- $\gamma 2$ seguido da imunomarcaço com anticorpos secundrios Alexa 594 e analisadas em microscpio de fluorescncia confocal. Foi observado que nas clulas controle e clulas silenciadas para $\gamma 1$ (A-C) aps 120 minutos de incubaco com EGF mais de 80% das molculas de EGF foram degradadas (ver grfico E). Nas clulas silenciadas para a expresso de $\gamma 2$ (D) mesmo aps 120 minutos de incubaco apenas aproximadamente 30% das molculas de EGF foram degradadas (E). A intensidade da fluorescncia de EGF foi quantificada com a utilizao do *software* ImageJ. Os valores representam a mdia relativa a intensidade de fluorescncia $\pm$ SEM de 10 clulas de cada condio. A mdia dos valores relativos ao tempo de 30 minutos no controle e para clulas silenciadas para $\gamma 1$ e $\gamma 2$ foi ajustada para 100%. Essas imagens so representativas de quatro experimentos independentes. O coeficiente

de Mander's representa o quanto da fluorescência do canal 1 também está presente no canal 2. Logo, o tM1 neste caso representa a quantidade de sinal das marcações do canal 594 que se sobrepõe ao sinal das marcações do canal 488 e em tM2, a quantidade de sinal das marcações do canal 488 que se sobrepõem ao sinal das marcações 594. Foi analisado a colocalização após o tratamento com o EGF por 30 minutos (**A e C**). Os dados para comparação foram obtidos de séries no plano Z e a análise da colocalização foi realizada utilizando o *software* ImageJ. Foi observado que $\gamma 1$ e $\gamma 2$ não apresentam diferenças significativas em sua colocalização com o EGF (tM1) (**F**). Contudo, foi observado que as moléculas de EGF estão significativamente mais colocalizadas com $\gamma 2$ do que com $\gamma 1$ (tM2) (**F**). * ($p < 0.05$) e *** ($p < 0.0005$). Barra = 10 μm . ns = não significativo.

5.1.2. A degradação lisossomal de EGFR ativado requer a participação da subunidade $\gamma 2$ de AP1

Inicialmente foi observado que a subunidade $\gamma 2$ de AP1 é importante para o processo de degradação de EGF internalizado. Também foi demonstrado que a redução da expressão de $\gamma 1$ não prejudicou a degradação do ligante. Em posse desse resultado foi analisado qual o efeito do silenciamento de $\gamma 2$ na degradação do receptor de EGF, EGFR. Para isto, inicialmente foi realizada uma padronização do tempo de degradação de EGFR após o tratamento com o ligante. As células foram tratadas com EGF e incubadas por diferentes tempos, em seguida foram lisadas e analisadas por *immunoblotting*. Com esta metodologia, foi observada uma redução crescente dos níveis de EGFR até 2 horas após a incubação, seguido, nos tempos posteriores, do aumento dos níveis de EGFR quase atingindo os níveis iniciais (Fig. 5A e B), o que deve representar EGFR recém-sintetizado. Para inibir a recuperação dos níveis de EGFR e ter uma melhor análise da degradação dos níveis totais do receptor ativado, as células foram tratadas com a droga cicloheximida (CHX), um inibidor da tradução em células eucarióticas, que interfere com a atividade peptidil transferase no ribossomo 60S e bloqueia a elongação da tradução do mRNA. Neste experimento as células foram tratadas com siRNA para silenciar $\gamma 2$, seguido da incubação com CHX e EGF, e incubação pelos tempos indicados até 2 horas. Ao final de cada tempo, as células foram lisadas e analisadas por *immunoblotting*. Nas células controle os níveis de EGFR reduziram de maneira crescente ao longo do tempo de incubação, passando a aproximadamente 20% do total inicial (Fig. 6A e D). Contudo, nas células silenciadas para $\gamma 2$ a degradação de EGFR ativado é prejudicada ao longo do tempo, ocorrendo de forma mais lenta que a degradação nas condições controle (Fig. 6B e D). Na figura 6C é possível evidenciar a eficiência do silenciamento de $\gamma 2$ (de aproximadamente 90%). Estes resultados sugerem uma importante participação de $\gamma 2$ na regulação negativa de complexos EGF-EGFR.

Figura 5: Padronização do tempo de degradação do receptor de EGF (EGFR).

Células HeLa foram incubadas por 1 hora com meio para transfecção (Opti-MEM) a 37 °C, em seguida foram incubadas com 50 ng/mL de EGF não marcado a 4 °C por 30 minutos, lavadas com PBS e incubadas a 37 °C pelos tempos indicados para monitorar a degradação do EGFR. Após a incubação as células foram lisadas e o extrato proteico submetido ao ensaio de *immunoblotting* para analisar os níveis totais de EGFR utilizando o anticorpo anti-EGFR. Foi observado que os níveis de EGFR nas células diminuiu até 2 horas de incubação (A e B). Após este tempo houve um aumento na quantidade da proteína presente no extrato celular (A e B). A marcação de β -actina foi utilizada como controle de carregamento (A). A densidade das bandas foi quantificada com o *software* ImageJ.

Figura 6: O silenciamento da subunidade $\gamma 2$ de AP1 prejudica a degradação do receptor de EGF (EGFR).

Células HeLa foram tratadas com siRNA controle (A) ou siRNA para $\gamma 2$ (B). Após o tratamento com o siRNA as células foram incubadas com meio para transfecção (Opti-MEM) por 1 hora a 37 °C, em seguida foram incubadas por 20 minutos com 20 μ g/mL de CHX a 37 °C, posteriormente com 50 ng/mL de EGF não marcado suplementado com 20 μ g/mL de CHX por 30 minutos a 4 °C, lavadas com PBS e incubadas por diferentes tempos a 37 °C, lisadas e o extrato proteico submetido ao ensaio de *immunoblotting* para analisar os níveis de EGFR utilizando o anticorpo anti-EGFR. Foi observado que nas células controle ocorre uma diminuição de aproximadamente 80% nos níveis de EGFR após 2 horas de incubação (A e D), enquanto que nas células

silenciadas para $\gamma 2$ a diminuição dos níveis de EGFR é reduzida, sendo degradado aproximadamente 60% após 2 horas de tratamento (**B e D**). Em (**C**) é possível observar que as células foram eficientemente silenciadas para a expressão de $\gamma 2$. A marcação de β -actina foi utilizada como controle de carregamento. A densidade das bandas foi quantificada com o *software* ImageJ.

5.1.3 A degradação de EGFR presente na superfície celular depende da participação da subunidade $\gamma 2$ de AP1

Foi observado que a degradação de EGFR após ativação por EGF é prejudicada com o silenciamento de $\gamma 2$. No entanto, o atraso observado em amostras de lisado total não elucidou a origem das moléculas de EGFR que tiveram sua degradação prejudicada. A fim de investigar se essas moléculas são originárias da membrana plasmática foram realizados ensaios de biotilação das proteínas da superfície para confirmar a hipótese de que $\gamma 2$ é importante para o processo de degradação de EGF-EGFR endocitado. Após o tratamento com o siRNA para diminuir os níveis de $\gamma 2$, as células foram induzidas a um estado de *starvation*, incubadas com uma solução de biotina impermeável à membrana plasmática, seguido da incubação com EGF e incubadas a 37 °C pelos tempos indicados. Em seguida, os lisados foram incubados com *beads* de neutravidina e analisadas por *immunoblotting*. A análise do resultado mostra que as células silenciadas para $\gamma 2$ tem a degradação de EGFR endocitado significativamente reduzida em comparação com a condição controle (Fig. 7A e B). Na condição controle ao longo de 4 horas, os níveis de EGFR provenientes da superfície celular são reduzidos em aproximadamente 80%, enquanto que na condição KD para $\gamma 2$ os níveis de EGFR são reduzidos em apenas aproximadamente 20% (Fig. 7C). Este mesmo experimento também foi realizado com o KD de $\gamma 1$, para averiguar se a isoforma $\gamma 2$ participa de maneira específica do processo de regulação negativa de EGF-EGFR. Foi observado que a degradação EGFR nas células controle e KD para $\gamma 1$ ocorrem de forma semelhante, nos dois casos os níveis de EGFR biotinilados são reduzidos em aproximadamente 80% após ativação com EGF (Fig. 8A, B e D), enquanto que na condição KD para $\gamma 2$ os níveis de EGFR são reduzidos em apenas aproximadamente 5% (Fig. 8C e D). Estes resultados demonstram que a degradação de moléculas de EGFR, provenientes da membrana plasmática, requer a subunidade $\gamma 2$ e que a subunidade $\gamma 1$ não participa deste processo, corroborando o observado para o ligante de EGFR, EGF (Fig. 4). Juntamente com outros dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa é possível levantar a hipótese de que AP1 contendo a subunidade $\gamma 2$ forma um complexo funcional e participa do direcionamento de cargas endocíticas para degradação lisossomal.

Figura 7: A subunidade $\gamma 2$ de AP1 possui um papel importante na degradação de EGFR.

Células HeLa foram tratadas com siRNA controle (A) ou siRNA para $\gamma 2$ (B). Após o tratamento com o siRNA as células foram incubadas com meio para transfecção (Opti-MEM) por 1 hora a 37 °C, em seguida incubadas por 30 minutos com 20 $\mu\text{g/mL}$ de CHX a 37 °C. Posteriormente as células foram incubadas com 50 ng/mL de EGF não marcado suplementado 20 $\mu\text{g/mL}$ de CHX por 30 minutos a 4 °C, lavadas com PBS gelado e incubadas com uma solução de biotina (0,2 mg/mL) por 30 minutos a 4 °C. Após as lavagens as células foram incubadas com DMEM completo a 37 °C pelos tempos indicados. Após os tempos de incubação as células foram lisadas e os extratos proteicos foram equalizados e incubados com *beads* de neutravidina, pré-lavadas, por 3 horas a 4 °C sob agitação. Após 3 lavagens com tampão de lise as proteínas foram eluídas com tampão de amostra e o extrato proteico foi submetido ao ensaio de *immunoblotting* para analisar os níveis de EGFR presentes na superfície utilizando o anticorpo anti-EGFR. Nas células controle (A e C) foi observado uma acentuada diminuição na quantidade de EGFR presente na superfície da célula (aproximadamente 75%). Nas células silenciadas para $\gamma 2$ (B e C) foi observado que houve apenas uma redução de aproximadamente 20% na quantidade de EGFR na superfície celular. O *input* representa 10% do lisado total. A marcação de β -actina foi utilizada como controle de carregamento das amostras no gel. A densidade das bandas foi quantificada com o *software* ImageJ e foi expressa em relação ao total de EGFR no tempo de 1 hora para as células controle ou silenciadas para $\gamma 2$. Os valores representam a média relativa $\pm$ SEM de três experimentos independentes. *, ($p < 0,05$); **, ($p < 0,005$).

5.2. A proteína Alix participa do processo de liberação de Nef do HIV-1 em vesículas extracelulares (EVs)

Em paralelo aos estudos sobre o papel da subunidade $\gamma 2$ de AP1 na degradação de complexos EGF-EGFR pela via dos MVBs, também foi estudado os mecanismos moleculares que regulam o direcionamento de Nef do HIV-1 para EVs. Para isto, foi analisado se a proteína acessória da maquinaria ESCRT, Alix é determinante para o direcionamento de Nef para EVs. Alix é uma proteína associada a maquinaria ESCRT, participa do controle da seleção de cargas para os MVBs e pode ser importante na seleção de proteínas que serão secretadas no interior de EVs (Friand, David and Zimmermann 2015). Foi observado que Alix é capaz de interagir fisicamente com Nef de forma direta (Costa et al. 2006), um processo importante para a degradação do receptor CD4 mediada por Nef (Amorim et al. 2014, daSilva-Januário 2014). Contudo, não existem evidências que demonstrem se esta interação é importante para o direcionamento de Nef para EVs.

Figura 8: O silenciamento da subunidade $\gamma 1$ de AP1 não prejudica a degradação de EGFR.

Células HeLa foram tratadas com siRNA controle (A) ou siRNA para $\gamma 1$ (B) ou siRNA para $\gamma 2$ (C). Após o tratamento com o siRNA as células foram incubadas com meio para transfecção (Opti-MEM) por 1 hora a 37 °C, em seguida incubadas por 30 minutos com 20 μ g/mL de CHX a 37 °C. Posteriormente as células foram incubadas com 50 ng/mL de EGF não marcado suplementado 20 μ g/mL de CHX por 30 minutos a 4 °C, lavadas com PBS gelado e incubadas com uma solução de biotina (0,2 mg/mL) por 30 minutos a 4 °C. Após as lavagens as células foram incubadas com DMEM completo a 37 °C pelos tempos indicados. Após os tempos de incubação as células foram lisadas e os extratos proteicos foram equalizados e incubados com beads de neutravidina pré-lavadas por 3 horas a 4 °C, sob agitação. Após 3 lavagens com tampão de lise as proteínas foram eluídas com tampão de amostra e o extrato proteico foi submetido ao ensaio de *immunoblotting* para analisar os níveis de EGFR presentes na superfície utilizando o anticorpo anti-EGFR. Nas células controle (A e D) foi observado uma acentuada diminuição na quantidade de EGFR presente na superfície da célula (aproximadamente 80%). Nas células silenciadas para $\gamma 2$ (C e D) foi observado que houve apenas uma redução de aproximadamente 10% na quantidade total de EGFR na superfície celular. Ao contrário do observado para $\gamma 2$, o silenciamento de $\gamma 1$ não prejudicou a degradação EGFR (B e D), corroborando os resultados obtidos com EGF (Fig. 4). O *input* representa 10% do lisado total. A marcação de β -actina foi utilizada como controle de carregamento das amostras no gel. A densidade das bandas foi quantificada com o *software* ImageJ e foi expressa em relação ao total de EGFR no tempo de 1 hora para as células controle e silenciadas para $\gamma 1$ ou $\gamma 2$.

5.2.1. A redução na expressão de Alix resulta na diminuição dos níveis de Nef secretado em EVs

Com o objetivo de analisar se Alix é importante para o direcionamento de Nef para EVs, foram realizados experimentos nos quais os níveis proteicos de Alix foram reduzidos por tratamento com siRNA, seguido da análise da liberação de Nef em EVs. Inicialmente, células HeLa foram tratadas com siRNA para Alix e transfectadas com plasmídeo codificante para Nef wt ou plasmídeo controle. Após 72 horas de incubação para produção de EVs, o sobrenadante foi coletado, EVs foram isoladas e os lisados celulares foram processados. Este ensaio inicial

de purificação das EVs foi realizado utilizando um *kit* comercial (*Total Exosome Isolation*) para isolamento das vesículas. As amostras foram analisadas por *immunoblotting* e foi observado que as EVs provenientes das células HeLa silenciadas para Alix apresentavam níveis reduzidos de Nef secretado em relação as amostras controle (Fig. 9B). A análise de densitometria das bandas mostrou que houve uma redução de aproximadamente 50% dos níveis de Nef na amostra silenciada para Alix (Fig. 9C). Para analisar se amostras estavam livres de contaminantes celulares foi realizada a marcação para EEA1 (uma proteína periférica de endossomos iniciais) que está presente apenas nos lisados celulares (Fig. 9A). O silenciamento de Alix foi eficiente e houve uma moderada diminuição dos níveis de Nef secretado em EVs provenientes de células HeLa (Fig. 9B e C).

Figura 9: O silenciamento de Alix prejudica a secreção de Nef em EVs provenientes de células HeLa.

Células HeLa foram tratadas com siRNA para Alix e como controle foram utilizadas células não tratadas com siRNA. Após o tratamento as células foram transfectadas ou não com Nef wt e incubadas por 72 horas a 37 °C com meio depletado de EVs para produção de EVs. Em seguida o sobrenadante foi coletado e as EVs foram isoladas utilizando o *kit Total Exosome Isolation* e as células lisadas para analisar os níveis intracelulares de Alix e Nef. No ensaio de *immunoblotting* foi observado que Alix foi eficientemente silenciado nas células alvo e que Nef foi expresso (**A e B**). Nas amostras de EVs (**B**) observamos a presença do marcador de EVs CD63 e a ausência de contaminantes celulares por meio da imunomarcagem com anti-EEA1, um marcador de endossomos iniciais. Foi evidenciado que houve uma redução dos níveis de Nef secretado nas células silenciadas para Alix em relação as células controle (**B e C**). A densidade das bandas foi quantificada com o *software ImageJ*.

5.2.2. Padronização do isolamento de EVs por ultracentrifugação

Baseado na evidência preliminar de que Alix poderia desempenhar uma ação importante na secreção de Nef em EVs, objetivou-se realizar novamente o experimento com o intuito de confirmar o achado e de analisar estatisticamente o efeito do silenciamento de Alix na secreção

de Nef. Para este experimento foi pensado em utilizar a linhagem A3.01, uma linhagem de linfócitos T CD4⁺, permissiva ao HIV-1, pois assim os efeitos analisados seriam mais fiéis ao que ocorre durante uma infecção. O isolamento das EVs realizado pelo *Kit* (Fig. 9) foi eficiente e não foram detectados contaminantes celulares, no entanto a análise por *immunoblotting* foi prejudicada com seu uso, pois as imagens obtidas após a revelação das membranas possuem ruídos que atrapalham a detecção das bandas para análise, isso se dá possivelmente devido a composição do *Kit* (Fig. 9B). Assim, a análise da secreção de Nef em linfócitos da linhagem A3.01 foi repetida, mas com as EVs sendo purificadas de maneira alternativa, por meio de ultracentrifugação, similar ao realizado por de Carvalho et al. (2014). Inicialmente foi padronizado o isolamento de EVs por ultracentrifugação. Para isto, a cultura de linfócitos foi cultivada em meio de cultura depletado de EVs, por 72h, seguido da purificação das EVs por ultracentrifugação (detalhes em Material e Métodos). As amostras foram analisadas por *immunoblotting* e foi evidenciado que a purificação das EVs foi eficiente (positivas para Alix) e que não ocorreu a contaminação com outras proteínas celulares (negativas para EEA1) (Fig. 10A). Células HeLa também foram utilizadas para padronização do isolamento de EVs por ultracentrifugação. Para o isolamento das EVs de células HeLa foram utilizados dois volumes distintos de meio de cultura (10 mL e 30 mL), condicionado por $1,0 \times 10^6$ células a cada 10 mL, respectivamente (Fig. 10B). Nestas amostras foi observado a eficiente purificação de EVs utilizando 30 mL de sobrenadante (Alix e β -actina positivas), e que não houve contaminação com membranas celulares (EEA1 negativas) (Fig. 10B). Utilizando-se ultracentrifugação para isolar as EVs, os ruídos observados no *immunoblotting* com a utilização do *kit* foram eliminados. O diâmetro médio das EVs isoladas do sobrenadante de linfócitos e sua concentração foi mensurada por meio do *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA). Utilizando este equipamento foi observado que o diâmetro médio das vesículas isoladas por ultracentrifugação foi de aproximadamente 155 nm (Fig. 10C).

5.2.3. Padronização do KD de Alix por transdução viral em linfócitos T CD4⁺

Após a padronização do isolamento das EVs foi realizada a padronização do KD de Alix por tratamento com shRNA mediado por transdução viral. As células transduzidas com o shRNA são resistentes à droga puromicina e o cultivo das células na presença da droga permite a seleção de células KD para Alix. Foi analisado o efeito do tratamento com o shRNA após 3 dias e 6 dias de tratamento com puromicina para seleção de células KD para Alix. A análise por *immunoblotting* mostrou que não houve redução nos níveis de Alix após a transdução viral

seguido do tratamento com puromicina por 3 dias (Fig. 11A). Por outro lado, as células cultivadas com a droga por 6 dias tiveram uma redução de aproximadamente 20% nos níveis de Alix, essa diminuição obtida foi estatisticamente significativa (Fig. 11A e B). A partir desse resultado foram realizados os ensaios para estudar a participação de Alix na secreção de Nef em EVs provenientes de linfócitos T CD4⁺.

Figura 10: Padronização do isolamento de EVs por ultracentrifugação.

Linfócitos A3.01 que expressam constitutivamente Nef e GFP ou GFP como controle negativo foram plaqueados na concentração de $2,0 \times 10^5$ células/mL (30 mL/condição) e incubadas por 72 horas a 37 °C com meio depletado de EVs para produção de EVs. Em seguida o sobrenadante foi coletado e as EVs foram isoladas por ultracentrifugação a 110.000xg por 1 hora 10 minutos a 4 °C e as células lisadas para análise por *immunoblotting* (A). Em (B) foram utilizados 10 mL e 30 mL de sobrenadante, coletados de células HeLa, para testar a quantidade necessária de sobrenadante para análise por *immunoblotting*, o sobrenadante foi submetido ao mesmo protocolo de isolamento por ultracentrifugação que (A). Nas amostras de EVs observamos a ausência de contaminantes celulares por meio da imunomarcação com anti-EEA1, um marcador de endossomos iniciais, demonstrando que o isolamento das EVs foi eficiente. Foi observado que com 30 mL de sobrenadante é possível a análise por *immunoblotting* (A e B), no entanto com 10 mL de sobrenadante proveniente de células HeLa não foi possível observar a presença de EVs (B). Em (C) se observa a distribuição do diâmetro médio em nm de EVs provenientes de células HeLa. As células foram cultivadas e o sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação como em (A), as EVs pelotadas foram concentradas em 50 μ L de PBS filtrado e submetido a análise no NTA. * indica bandas inespecíficas utilizadas como controle de carregamento.

5.2.4. Alix é importante para a secreção de Nef em EVs provenientes de linfócitos T CD4⁺

Baseado nesta primeira evidência de que Alix poderia desempenhar uma ação importante na secreção de Nef em EVs (Fig. 9), este experimento foi realizado novamente com o intuito de confirmar o achado em células permissivas a infecção pelo HIV-1, tais como os linfócitos T CD4⁺. Para tal, linfócitos da linhagem A3.01, contendo um sistema de tradução para a coexpressão das proteínas Nef e GFP ou apenas GFP foram utilizados (de Carvalho et al. 2014). As células foram tratadas com shRNA por meio de transdução viral para reduzir os níveis de Alix. As EVs foram isoladas por ultracentrifugação após 72h de cultivo em meio livre de EVs. As amostras foram analisadas por *immunoblotting* e foi observado que as células tratadas com shRNA para Alix tiveram uma diminuição significativa de aproximadamente 50%

dos níveis de Nef secretado em EVs (Fig. 12B e C), resultado consistente com o observado em células HeLa (Fig. 9C). Os experimentos também mostraram que não haviam contaminantes celulares presentes nos purificados de EVs, representado pela ausência de EEA1 (Fig. 12A e B), mostrando que o isolamento das EVs foi eficiente. Além disso, outras proteínas presentes em EVs, como GFP e proteínas inespecíficas reconhecidas pelos anticorpos mostraram níveis similares independente do tratamento com shRNA para Alix, demonstrando que o silenciamento de Alix não afetou os níveis de outras cargas nas EVs. Este resultado, somado ao resultado anterior reforça a evidência encontrada pelo nosso grupo de que Nef é secretado em EVs de forma dependente de Alix e que esse efeito é reproduzível em células permissivas a infecção pelo HIV-1.

Figura 11: Padronização do KD de Alix por meio de transdução viral.

Linfócitos A3.01 que expressam constitutivamente Nef e GFP ou GFP como controle negativo foram tratados com shRNA por meio de transdução viral para reduzir os níveis de expressão de Alix. Após o tratamento as células foram incubadas com a droga puromicina 1μM para seleção dos linfócitos KD para Alix. Células que foram eficientemente transduzidas adquirem resistência a droga. Com 3 dias de incubação com a droga as células controle morrem, no entanto não é possível notar uma redução nos níveis de Alix, já com 6 dias de incubação com a droga nota-se uma redução nos níveis de Alix nas análises por *immunoblotting* (A). Na análise gráfica, em (B) observa-se uma redução de aproximadamente 20% dos níveis de Alix. Apesar da baixa eficiência do silenciamento de Alix a redução obtida é estatisticamente significativa. A densidade das bandas foi quantificada com o *software* ImageJ. Os valores representam a média relativa $\pm$ SEM de sete experimentos independentes. **, ($p < 0,005$). β-actina foi utilizada como controle de carregamento. * indica bandas inespecíficas.

5.2.5. A interação de Alix e Nef ocorre em regiões contendo Rab27a e CD63

As proteínas Rabs são pequenas GTPases que controlam diversas etapas do tráfego vesicular, como brotamento, motilidade, ancoramento e fusão de diferentes membranas de transportes com seus compartimentos alvo (Zerial and McBride 2001). Rab27a e Rab27b participam ativamente do processo de direcionamento e fusão dos MVBs com a membrana

plasmática, permitindo a liberação de EVs para o meio extracelular (Zhang et al. 2015, Li et al. 2014, Ostrowski et al. 2010).

Figura 12: Alix participa da secreção de Nef em EVs provenientes de Linfócitos T CD4⁺ (A3.01).

Linfócitos A3.01 que expressam constitutivamente Nef e GFP ou GFP como controle negativo foram tratados com shRNA por meio de transdução viral para reduzir os níveis de Alix. Após o tratamento as células foram incubadas com a droga puromicina 1 μ M para seleção dos linfócitos KD para Alix. Após a seleção as células foram incubadas por 72 horas a 37 °C com meio depletado de EVs para produção de EVs. Em seguida o sobrenadante foi coletado e as EVs foram isoladas por ultracentrifugação a 110.000xg por 1 hora 10 minutos a 4 °C e as células lisadas para análise dos níveis intracelulares de Alix e Nef. No ensaio de *immunoblotting* foi observado que Alix foi silenciado nas células alvo, no entanto o silenciamento não foi tão eficiente quanto esperado (**A e B**). Nas amostras de EVs (**B**) observamos a ausência de contaminantes celulares por meio da imunomarcagem com anti-EEA1, um marcador de endossomos iniciais, demonstrando que o isolamento das EVs foi eficiente. Apesar da baixa eficiência do silenciamento de Alix foi evidenciado que houve uma diminuição de aproximadamente 50% dos níveis de Nef secretado nas células KD para Alix em relação as células controle (**C**). A densidade das bandas foi quantificada com o *software* ImageJ. Os valores representam a média relativa $\pm$ SEM de três experimentos independentes. ***, (p < 0,0005). * indica bandas inespecíficas utilizadas como controle de carregamento.

Baseado na importância de Rab27 para a liberação de EVs, foi analisado se a interação de Nef e Alix ocorre em vesículas positivas Rab27a. A localização subcelular da interação entre Nef e Alix foi analisada por BiFC. No ensaio de BiFC as proteínas de interesse são traduzidas em fusão com o domínio N ou C terminal da proteína Venus, uma variante da proteína de fluorescência amarela YFP. Se ocorrer interação entre as proteínas de interesse, neste caso Alix e Nef, a aproximação entre os domínios da proteína Venus é suficiente para a reconstituição de sua fluorescência (detalhes em Material e Métodos). Nef e Alix foram cotransfectados com DsRed-Rab27a e a análise permitiu observar que os pontos fluorescentes correspondentes a interação entre Nef e Alix se encontravam sobrepostos a DsRed-Rab27a (Figura 13A). EVs são ricas em tetraspaninas, uma superfamília de proteínas com mais de 30 membros, definida pela presença de quatro domínios transmembrana. A maioria das tetraspaninas é altamente glicosilada e possuem vários parceiros de interação transmembrana e citosólica (Andreu and

Yáñez-Mó 2014). CD63 é uma tetraspanina enriquecida em MVBs e EVs, sendo geralmente utilizada como marcador dessas vesículas. Interessantemente, a interação entre Nef e Alix também apresentou uma distribuição sobreposta com a marcação de CD63, mas não com vesículas positivas para EEA1, um marcador de endossomos iniciais (Figura 13B e C, respectivamente). Em conjunto, estes resultados indicam a associação entre Nef e Alix em MVBs associados com a liberação de EVs. O processo de ativação e desativação das Rabs é baseado na hidrólise e troca de GDP por GTP. O uso de formas mutantes das proteínas Rab que estão constitutivamente associados com o GDP ou GTP auxilia no estudo da importância destas proteínas para uma determinada via de transporte (Zerial and McBride 2001). Especificamente, Rab5 participa do processo de maturação de endossomos iniciais para endossomos tardios e o uso de formas mutantes de Rab5 perturbam esse processo (Stenmark et al. 1994). A superexpressão de Rab5 Q79L, um mutante que é constitutivamente associado a GTP, gera endossomos com tamanho aumentado devido ao bloqueio do processo de amadurecimento dos endossomos iniciais (Stenmark et al. 1994). Alix e Nef foram cotransfectados com mCherry-Rab5 Q79L e foi analisada a localização subcelular da interação em células expressando mCherry-Rab5 Q79L. A análise por microscópio confocal mostrou a presença de Alix e Nef associados à membrana limitante dos endossomos aumentados (Fig. 13D). A presença de Nef e Alix na membrana desses endossomos reforça a hipótese de que Nef é recrutado para as ILVs presentes nos MVBs de forma dependente de Alix.

Figura 13: Análise da localização subcelular da interação entre Nef e Alix.

Células HeLa foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro e transfectadas com plasmídeos que codificam Nef fusionado aos resíduos 1-158 da proteína Venus (Nef-VNt) e Alix fusionada aos resíduos 159-239 de Venus (VCt-Alix). Em (A), as células foram cotransfectadas com plasmídeo para expressão de DsRed-Rab27a. Em (D) cotransfectadas com mCherry-Rab5 Q79L. As células foram fixadas após 10 horas de incubação a 37 °C, em seguida foram permeabilizadas e imunomarcadas com anticorpos anti-CD63 (B) e anti-EEA1 (C) seguido da imunomarcção com anticorpos secundários Alexa 594 (canal vermelho). As células foram analisadas em microscópio de fluorescência confocal. Pontos amarelos no *Merge* indicam colocalização. Barra = 10 μm. Os *insets* representados pelos quadrados possuem uma magnificação de 3x.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as isoformas $\gamma 1$ e $\gamma 2$ da subunidade γ do complexo AP1 podem compor complexos AP1 com funções distintas no transporte intracelular de proteínas. O silenciamento de $\gamma 2$, mas não de $\gamma 1$, leva ao atraso da degradação de EGF internalizado (Fig. 4). Somado a este resultado também foi observado que a degradação de EGFR ativado é comprometida em células silenciadas para $\gamma 2$, resultado observado nos níveis totais de EGFR (Fig. 6) e nos níveis de EGFR provenientes da membrana plasmática (Fig. 7 e 8). Este estudo permitiu demonstrar que AP1 composto pela isoforma $\gamma 2$ (AP1 $\gamma 2$) é um agente importante no direcionamento para a via de degradação lisossomal a partir da membrana plasmática, e que AP1 $\gamma 1$ não participa desta via de transporte (Fig. 14, modelo proposto). De fato, foi recentemente demonstrado por nosso grupo que $\gamma 1$ e $\gamma 2$ apresentam distribuição parcialmente distinta na célula (Tavares et al. 2017), e estão mais concentrados na região perinuclear (Fig. 4A e C). Somado a isto foi observado que EGF internalizado colocaliza significativamente mais com $\gamma 2$ do que com $\gamma 1$ (Fig. 4F). É importante destacar que algumas evidências na literatura apontam para o papel de $\gamma 2$ no processo de degradação lisossomal de proteínas. $\gamma 2$ interage com componentes da maquinaria ESCRT (Döring et al. 2010), e pode interagir com cargas ubiquitinadas levando a sua degradação (Rost et al. 2008, Rost et al. 2006). Os resultados obtidos neste trabalho mostram de forma comparativa que $\gamma 2$ está envolvido no processo de degradação do complexo EGF-EGFR na via canônica, processo que não requer $\gamma 1$.

Apenas AP1, AP2 e AP3 possuem diferentes isoformas para as suas subunidades, essa característica ainda não foi descrita para AP4 e AP5. Existe evidência de que diferentes isoformas de subunidades possuem um papel decisivo na interação com diferentes proteínas nas células, mas a via de transporte mediada é a mesma. Por exemplo, foi demonstrado para AP1 que as duas isoformas da subunidade $\mu 1$ ($\mu 1A$ e $\mu 1B$) reconhecem diferentes cargas vesiculares que são transportadas pela via clássica atribuída a AP1, entre TGN e endossomos (Bonifacino 2014). AP1 é o adaptador que mais possui isoformas para suas subunidades, tendo potencial para gerar uma maior diversidade funcional para o complexo (Boehm and Bonifacino 2002). Os diferentes papéis do complexo AP1, composto pelas subunidades $\gamma 1$ ou $\gamma 2$, no transporte de proteínas e vias de transporte diferentes é interessante, pois permite que AP1 controle o transporte de cargas em duas regiões diferentes, entre TGN e endossomos (AP1 $\gamma 1$) e na via de degradação a partir da membrana plasmática (AP1 $\gamma 2$), como proposto neste trabalho

(Fig. 14). Esta observação faz sentido pois as subunidades grandes dos APs, especificamente γ e $\beta 1$ tem um importante papel na localização do adaptador nos compartimentos da célula (Ren et al. 2013). De fato, como observado nas figuras 4, 7 e 8, fica evidente os distintos papéis desempenhados por estas isoformas no processo de degradação do complexo EGF-EGFR. O achado de que isoformas de subunidades possam controlar vias distintas no tráfego em um mesmo tipo celular ainda não foi observado para os demais APs.

Estes resultados obtidos são parte de um trabalho que visou entender se as isoformas $\gamma 1$ e $\gamma 2$ possuem papéis distintos no processo de degradação do receptor CD4 mediado por Nef do HIV-1 (Tavares et al. 2017; em anexo). Os resultados mostraram que Nef requer a isoforma $\gamma 2$ para a eficiente degradação de CD4 endocitado e direcionado para MVBs. Neste sistema envolvendo Nef, o processo de endocitose requer a participação de AP2 e é seguido pelo envio de CD4 aos MVBs e degradação em lisossomos com a participação de AP1 contendo a isoforma $\gamma 2$. Estes achados mostram o papel coordenado desempenhado pelos APs no tráfego intracelular de proteínas e que ainda há muito para compreender sobre os mecanismos de transporte de proteínas nas células eucarióticas.

O segundo conjunto de resultados obtidos neste trabalho mostra o envolvimento de Alix na liberação de Nef em EVs (Fig. 14, modelo proposto). Foi observado que células HeLa silenciadas para a proteína Alix são menos eficientes na liberação de Nef em EVs (Fig. 9). O mesmo ensaio foi realizado em linfócitos, sendo observado que a diminuição dos níveis de Alix diminui significativamente a liberação de Nef em EVs (Fig. 12). Estes resultados indicam que a participação de Alix na liberação de Nef em EVs não depende do tipo celular, mas demonstram que a liberação de Nef em EVs provenientes de células permissivas ao HIV-1 dependem da atividade de Alix. O uso dos linfócitos em nossos experimentos foi importante, pois confirma nossa hipótese em outro tipo celular e aproxima o conhecimento obtido com os resultados do que realmente possa ocorrer durante a infecção pelo HIV-1.

O conceito de exossomos está associado a um subtipo de vesículas extracelulares, de 30 a 100 nm de diâmetro, que tem origem endossomal e são liberadas como consequência da fusão dos MVBs com a membrana plasmática (Colombo et al. 2014). Já as vesículas extracelulares conhecidas como microvesículas referem-se geralmente a vesículas derivadas diretamente da membrana plasmática, com tamanho de 150 nm a 1 μ m (Colombo et al. 2014). No entanto, estes conceitos se tornaram obsoletos devido à dificuldade de separar exossomos de outros tipos de EVs. A caracterização do tamanho das vesículas isoladas por ultracentrifugação revelou que estas tinham o diâmetro médio de aproximadamente 155 nm (Fig. 10C). Este tamanho encontra-

se próximo ao das vesículas classicamente denominadas de exossomos. Apesar das vesículas isoladas terem o tamanho médio acima de 100 nm, elas aparentam ser provenientes da liberação mediada pelos MVBs devido a presença de Alix (Fig. 9, 10 e 12) e também a alteração da composição dessas vesículas quando as células apresentam níveis reduzidos de Alix (Fig. 9 e 12). Essa dificuldade de definir a origem das vesículas em uma amostra e que restringe exossomos como vesículas de 30-100 nm fez com que a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) (encontro realizado em 2016 em São Paulo) recomendasse o uso do termo genérico de vesículas extracelulares (EVs).

Alix desempenha um papel importante na seleção de proteínas cargas para as ILVs, bem como outros processos celulares como a citocinese. O achado da relação de Alix com o processo de citocinese foi identificado a partir da observação de que células silenciadas para Alix ficam maiores e com o processo de divisão mais lento (Morita et al. 2007b, Carlton and Martin-Serrano 2007). A importante participação de Alix no processo de citocinese poderia ser o fator que limita os níveis de KD observado nos linfócitos (Fig. 12). Após os 6 dias de incubação com a droga de seleção são necessárias mais 72 horas de incubação para produção de EVs, nesse longo período de tempo a morte celular causada pelo KD de Alix pode elevar a quantidade de células não transduzidas em detrimento das células transduzidas. Outra explicação seria que a sequência alvo do shRNA utilizado tem uma baixa eficiência se fazendo necessário testar outras sequências. No entanto, apesar da baixa eficiência no KD de Alix, foi observado uma visível redução, estatisticamente significativa, dos níveis de Nef secretados em EVs provenientes dos linfócitos tratados com shRNA para Alix (Fig. 12B e C).

A interação de Alix com sintenina-SDC leva ao direcionamento de Alix para o interior de ILVs nos MVBs (Baietti et al. 2012). Os resultados obtidos indicam que a interação entre Nef e Alix ocorre em vesículas que são positivas para Rab27a e CD63 (Fig. 13A e B, respectivamente). A colocalização de Alix e Nef com CD63 já foi descrita (Amorim et al. 2014), mas, apenas esse dado não é suficiente para concluir que as estruturas observadas se tratam de MVBs que serão fusionados com a membrana plasmática para a liberação de EVs. Contudo, a presença de Alix e Nef em vesículas positivas para Rab27a reforça a hipótese de que Alix medeia o direcionamento de Nef para EVs, devido ao papel de Rab27a no direcionamento dos MVBs para a membrana plasmática (Fig. 13A). Interessantemente, o uso de Rab5-GTP ligado, que culmina na parada do processo de maturação do endossomo e redução do transporte anterógrado, permitiu a visualização da interação entre Nef e Alix na membrana destes endossomos que não contém ILVs. É possível especular que em condições normais a maturação

do endossomo levaria a internalização de Alix, mediada pela interação com sintenina-SDC (Baietti et al. 2012), e consequentemente de Nef, por intermédio de sua interação com Alix (Fig. 14). No entanto, outros experimentos seriam necessários para confirmar esta hipótese.

O papel da proteína Nef secretada em EVs começou a ser elucidado apenas recentemente, junto com o aumento no interesse em estudar as EVs. Os achados indicam que o papel de Nef liberado em EVs facilita o processo de replicação e progressão da infecção do HIV (de Carvalho et al. 2014, Lenassi et al. 2010). Alix é essencial a degradação do receptor CD4 mediada por Nef, direcionando o receptor para degradação lisossomal (Amorim et al., 2014, daSilva-Januário 2014). Interessantemente, Nef aumenta o envio de CD4 para os MVBs de forma dependente de Alix, ao mesmo tempo que diminui os níveis de CD4 liberados em EVs (Amorim et al. 2014, de Carvalho et al. 2014). Contudo, Nef parece não ter o mesmo destino que CD4 nos MVBs, não seguindo a rota de degradação lisossomal, pois o tratamento com drogas que inibem o processo de degradação lisossomal, como Bafilomicina1A não afetam os níveis de Nef, mas recuperam os níveis de CD4 (Amorim et al. 2014, daSilva-Januário 2014). Vale ressaltar que a maquinaria ESCRT envia ativamente proteínas para o interior dos MVBs em ILVs, mas os componentes dessa maquinaria não são internalizados juntamente com seus alvos, ficando associados na superfície dos MVBs (Henne et al. 2011). Por outro lado, Alix e outros componentes da maquinaria ESCRT, como TSG101, CHMP4, entre outros, são detectados no interior de EVs, indicando que em algum momento estes componentes são internalizados nas ILVs destinadas a secreção. Este poderia ser um possível mecanismo que determina o destino das vesículas, se elas serão degradadas (ausência de Alix e outros componentes da maquinaria ESCRT) ou se elas serão liberadas como EVs (presença de Alix e outros componentes da maquinaria ESCRT). Os resultados obtidos até o momento não permitem concluir como se dá este mecanismo de seleção do destino das ILVs na célula, mas demonstram o importante papel de Alix no endereçamento de Nef aos MVBs e sua liberação em EVs (Fig. 14, modelo proposto).

Figura 14: A eficiente degradação de complexos EGF-EGFR é dependente de AP1 γ 1 e Alix participa da liberação de Nef em EVs, ambas as vias mediadas por MVBs.

Juntos esses resultados indicam que o complexo AP1 contendo a isoforma γ 2 é importante na via de degradação canônica dos MVBs, levando a eficiente degradação de complexos EGF-EGFR em lisossomos. A função precisa do complexo AP1 γ 2 não está clara, mas o mesmo poderia estar envolvido na retenção de carga no endossomo primário ou participar diretamente do processo de maturação de endossomos primários em endossomos tardios. Já, AP1 contendo a isoforma γ 1 não está associado a esta via. Também foi demonstrado a importância da proteína acessória à maquinaria ESCRT, Alix, na liberação de Nef do HIV-1, em EVs derivadas da fusão dos MVBs com a membrana plasmática. Os resultados observados permitiram concluir que a liberação de Nef em EVs é dependente de sua interação com Alix. É possível especular que a internalização de Nef é mediada por sua interação com o complexo Alix-sintenina-SDC. No entanto, outros experimentos são necessários para confirmar esta hipótese.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- AP1 contendo $\gamma 2$ participa do direcionamento de receptores de sinalização da superfície celular, ativados (EGF-EGFR), para degradação em lisossomos na via canônica dos MVBs.
- As subunidades $\gamma 1$ e $\gamma 2$ compõe complexos AP1 distintos que regulam diferentes vias de transporte.
- Alix é importante para a eficiente liberação de Nef em EVs provenientes de HeLa e de células permissivas a infecção pelo HIV, como os linfócitos T CD4⁺.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim, N. A., E. M. da Silva, R. O. de Castro, M. E. da Silva-Januário, L. M. Mendonça, J. S. Bonifacino, L. J. da Costa & L. L. daSilva (2014) Interaction of HIV-1 Nef protein with the host protein Alix promotes lysosomal targeting of CD4 receptor. *J Biol Chem*, 289, 27744-56.
- Andreu, Z. & M. Yáñez-Mó (2014) Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*, 5, 442.
- Babst, M. (2011) MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr Opin Cell Biol*, 23, 452-7.
- Babst, M., D. J. Katzmann, W. B. Snyder, B. Wendland & S. D. Emr (2002) Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, 3, 283-9.
- Bache, K. G., A. Brech, A. Mehlum & H. Stenmark (2003) Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, 162, 435-42.
- Baietti, M. F., Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann & G. David (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*, 14, 677-85.
- Baltes, J., J. V. Larsen, K. Radhakrishnan, C. Geumann, M. Kratzke, C. M. Petersen & P. Schu (2014) σ 1B adaptin regulates adipogenesis by mediating the sorting of sortilin in adipose tissue. *J Cell Sci*, 127, 3477-87.
- Bishop, N. & P. Woodman (2001) TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J Biol Chem*, 276, 11735-42.
- Bissig, C. & J. Gruenberg (2014) ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol*, 24, 19-25.
- Boehm, M. & J. S. Bonifacino (2002) Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene*, 286, 175-86.
- Bonifacino, J. S. (2014) Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Biol*, 204, 7-17.
- Burtey, A., J. Z. Rappoport, J. Bouchet, S. Basmaciogullari, J. Guatelli, S. M. Simon, S. Benichou & A. Benmerah (2007) Dynamic interaction of HIV-1 Nef with the clathrin-mediated endocytic pathway at the plasma membrane. *Traffic*, 8, 61-76.
- Carlson, L. A. & J. H. Hurley (2012) In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 16928-33.
- Carlton, J. G. & J. Martin-Serrano (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*, 316, 1908-12.
- Ceresa, B. P. & J. L. Peterson (2014) Cell and molecular biology of epidermal growth factor receptor. *Int Rev Cell Mol Biol*, 313, 145-78.
- Chaudhuri, R., O. W. Lindwasser, W. J. Smith, J. H. Hurley & J. S. Bonifacino (2007) Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on

- clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol*, 81, 3877-90.
- Christ, L., C. Raiborg, E. M. Wenzel, C. Campsteijn & H. Stenmark (2017) Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem Sci*, 42, 42-56.
- Colombo, M., G. Raposo & C. Théry (2014) Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.
- Costa, L. J., N. Chen, A. Lopes, R. S. Aguiar, A. Tanuri, A. Plemenitas & B. M. Peterlin (2006) Interactions between Nef and AIP1 proliferate multivesicular bodies and facilitate egress of HIV-1. *Retrovirology*, 3, 33.
- Dacks, J. B. & M. C. Field (2007) Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J Cell Sci*, 120, 2977-85.
- daSilva-Januário, M., E. Januário, Y., C. deCarvalho, J., V. and daSilva, L., L., P. (2016) Exosomes: Biogenesis, therapeutic applications and emerging research. Capítulo 1: Molecular mechanisms of exosome biogenesis. Nova Science Publishers, Inc. New York.
- daSilva-Januário, M. E. (2014) Estudo sobre a interferência da proteína Nef do HIV-1 no tráfego intracelular de proteínas da célula hospedeira. Monografia. 66f. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- daSilva, L. L., R. Sougrat, P. V. Burgos, K. Janvier, R. Mattera & J. S. Bonifacino (2009) Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein targets CD4 to the multivesicular body pathway. *J Virol*, 83, 6578-90.
- de Carvalho, J. V., R. O. de Castro, E. Z. da Silva, P. P. Silveira, M. E. da Silva-Januário, E. Arruda, M. C. Jamur, C. Oliver, R. S. Aguiar & L. L. daSilva (2014) Nef neutralizes the ability of exosomes from CD4⁺ T cells to act as decoys during HIV-1 infection. *PLoS One*, 9, e113691.
- Dores, M. R., M. M. Paing, H. Lin, W. A. Montagne, A. Marchese & J. Trejo (2012) AP-3 regulates PAR1 ubiquitin-independent MVB/lysosomal sorting via an ALIX-mediated pathway. *Mol Biol Cell*, 23, 3612-23.
- Döring, T., K. Gotthardt, J. Stieler & R. Prange (2010) γ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunits. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 1252-64.
- Eastman, S. W., J. Martin-Serrano, W. Chung, T. Zang & P. D. Bieniasz (2005) Identification of human VPS37C, a component of endosomal sorting complex required for transport-I important for viral budding. *J Biol Chem*, 280, 628-36.
- Felder, S., K. Miller, G. Moehren, A. Ullrich, J. Schlessinger & C. R. Hopkins (1990) Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell*, 61, 623-34.
- Foster, J. L. & J. V. Garcia (2008) HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology*, 5, 84.
- Friand, V., G. David & P. Zimmermann (2015) Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. *Biol Cell*, 107, 331-41.

- Fölsch, H., M. Pypaert, P. Schu & I. Mellman (2001) Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*, 152, 595-606.
- Grootjans, J. J., G. Reekmans, H. Ceulemans & G. David (2000) Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *J Biol Chem*, 275, 19933-41.
- Guo, X., R. Mattera, X. Ren, Y. Chen, C. Retamal, A. González & J. S. Bonifacino (2013) The adaptor protein-1 μ 1B subunit expands the repertoire of basolateral sorting signal recognition in epithelial cells. *Dev Cell*, 27, 353-66.
- Henne, W. M., N. J. Buchkovich & S. D. Emr (2011) The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 21, 77-91.
- Jimenez, A. J., P. Maiuri, J. Lafaurie-Janvore, S. Divoux, M. Piel & F. Perez (2014) ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, 343, 1247136.
- Johnstone, R. M., A. Mathew, A. B. Mason & K. Teng (1991) Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol*, 147, 27-36.
- Katzmann, D. J., G. Odorizzi & S. D. Emr (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 893-905.
- Kirchhausen, T., D. Owen & S. C. Harrison (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016725.
- Klumperman, J. & G. Raposo (2014) The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016857.
- Kostelansky, M. S., C. Schluter, Y. Y. Tam, S. Lee, R. Ghirlando, B. Beach, E. Conibear & J. H. Hurley (2007) Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell*, 129, 485-98.
- Langelier, C., U. K. von Schwedler, R. D. Fisher, I. De Domenico, P. L. White, C. P. Hill, J. Kaplan, D. Ward & W. I. Sundquist (2006) Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J Virol*, 80, 9465-80.
- Lenassi, M., G. Cagney, M. Liao, T. Vaupotic, K. Bartholomeeusen, Y. Cheng, N. J. Krogan, A. Plemenitas & B. M. Peterlin (2010) HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4⁺ T cells. *Traffic*, 11, 110-22.
- Li, W., Y. Hu, T. Jiang, Y. Han, G. Han, J. Chen & X. Li (2014) Rab27A regulates exosome secretion from lung adenocarcinoma cells A549: involvement of EPI64. *APMIS*, 122, 1080-7.
- Li, X., Y. Niu, M. Cheng, X. Chi, X. Liu & W. Yang (2016) AP1S3 is required for hepatitis C virus infection by stabilizing E2 protein. *Antiviral Res*, 131, 26-34.
- Lindwasser, O. W., R. Chaudhuri & J. S. Bonifacino (2007) Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Curr Mol Med*, 7, 171-84.

- Lu, Q., L. W. Hope, M. Brasch, C. Reinhard & S. N. Cohen (2003) TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7626-31.
- Madrid, R., K. Janvier, D. Hitchin, J. Day, S. Coleman, C. Novello, J. Bouchet, A. Benmerah, J. Guatelli & S. Benichou (2005) Nef-induced alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity. *J Biol Chem*, 280, 5032-44.
- Mattera, R., M. Boehm, R. Chaudhuri, Y. Prabhu & J. S. Bonifacino (2011) Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. *J Biol Chem*, 286, 20222-30.
- Morita, E., V. Sandrin, S. L. Alam, D. M. Eckert, S. P. Gygi & W. I. Sundquist (2007a) Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding. *Cell Host Microbe*, 2, 41-53.
- Morita, E., V. Sandrin, H. Y. Chung, S. G. Morham, S. P. Gygi, C. K. Rodesch & W. I. Sundquist (2007b) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J*, 26, 4215-27.
- Morita, E. & W. I. Sundquist (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 395-425.
- Olmos, Y., L. Hodgson, J. Mantell, P. Verkade & J. G. Carlton (2015) ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature*, 522, 236-9.
- Ostrowski, M., N. B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C. F. Moita, K. Schauer, A. N. Hume, R. P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M. C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L. F. Moita & C. Thery (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*, 12, 19-30; sup pp 1-13.
- Paczkowski, J. E., B. C. Richardson & J. C. Fromme (2015) Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol*, 25, 408-16.
- Pereira, E. A. & L. L. daSilva (2016) HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic*, 17, 976-96.
- Raab, M., M. Gentili, H. de Belly, H. R. Thiam, P. Vargas, A. J. Jimenez, F. Lautenschlaeger, R. Voituriez, A. M. Lennon-Duménil, N. Manel & M. Piel (2016) ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science*, 352, 359-62.
- Raiborg, C. & H. Stenmark (2002) Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct Funct*, 27, 403-8.
- Ren, X., G. G. Farías, B. J. Canagarajah, J. S. Bonifacino & J. H. Hurley (2013) Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell*, 152, 755-67.
- Robinson, D. G. & P. Pimpl (2014) Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci*, 19, 134-9.
- Robinson, M. S. (2015) Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic*, 16, 1210-38.

- Roeth, J. F. & K. L. Collins (2006) Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70, 548-63.
- Rost, M., T. Döring & R. Prange (2008) gamma2-Adaptin, a ubiquitin-interacting adaptor, is a substrate to coupled ubiquitination by the ubiquitin ligase Nedd4 and functions in the endosomal pathway. *J Biol Chem*, 283, 32119-30.
- Rost, M., S. Mann, C. Lambert, T. Döring, N. Thomé & R. Prange (2006) Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J Biol Chem*, 281, 29297-308.
- Sanfridson, A., S. Hester & C. Doyle (1997) Nef proteins encoded by human and simian immunodeficiency viruses induce the accumulation of endosomes and lysosomes in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 873-8.
- Stenmark, H., R. G. Parton, O. Steele-Mortimer, A. Lütcke, J. Gruenberg & M. Zerial (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J*, 13, 1287-96.
- Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova & H. G. Göttlinger (2003) AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, 114, 689-99.
- Stuchell, M. D., J. E. Garrus, B. Müller, K. M. Stray, S. Ghaffarian, R. McKinnon, H. G. Kräusslich, S. G. Morham & W. I. Sundquist (2004) The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem*, 279, 36059-71.
- Stumptner-Cuvelette, P., M. Jouve, J. Helft, M. Dugast, A. S. Glouzman, K. Jooss, G. Raposo & P. Benaroch (2003) Human immunodeficiency virus-1 Nef expression induces intracellular accumulation of multivesicular bodies and major histocompatibility complex class II complexes: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Biol Cell*, 14, 4857-70.
- Tavares, L. A., E. M. da Silva, M. E. da Silva-Januário, Y. C. Januário, J. V. de Cavalho, É. Czernisz, G. A. Mardones & L. L. daSilva (2017) CD4 downregulation by the HIV-1 protein Nef reveals distinct roles for the $\gamma 1$ and $\gamma 2$ subunits of the AP-1 complex in protein trafficking. *J Cell Sci*, 130, 429-443.
- von Zastrow, M. & A. Sorkin (2007) Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 436-45.
- Zerial, M. & H. McBride (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 107-17.
- Zhai, Q., R. D. Fisher, H. Y. Chung, D. G. Myszka, W. I. Sundquist & C. P. Hill (2008) Structural and functional studies of ALIX interactions with YPX(n)L late domains of HIV-1 and EIAV. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 43-9.
- Zhai, Q., M. B. Landesman, H. Robinson, W. I. Sundquist & C. P. Hill (2011) Identification and structural characterization of the ALIX-binding late domains of simian immunodeficiency virus SIVmac239 and SIVagmTan-1. *J Virol*, 85, 632-7.
- Zhang, L., S. Zhang, J. Yao, F. J. Lowery, Q. Zhang, W. C. Huang, P. Li, M. Li, X. Wang, C. Zhang, H. Wang, K. Ellis, M. Cheerathodi, J. H. McCarty, D. Palmieri, J. Saunus, S. Lakhani, S. Huang, A. A. Sahin, K. D. Aldape, P. S. Steeg & D. Yu (2015)

Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*, 527, 100-4.

Zimmermann, P., D. Tomatis, M. Rosas, J. Grootjans, I. Leenaerts, G. Degeest, G. Reekmans, C. Coomans & G. David (2001) Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Mol Biol Cell*, 12, 339-50.

Anexo

RESEARCH ARTICLE

CD4 downregulation by the HIV-1 protein Nef reveals distinct roles for the $\gamma 1$ and $\gamma 2$ subunits of the AP-1 complex in protein trafficking

Lucas A. Tavares^{1,*}, Eulália M. L. da Silva^{1,*}, Mara E. da Silva-Januário¹, Yunan C. Januário¹, Julianne V. de Cavalho¹, Érika S. Czernisz¹, Gonzalo A. Mardones² and Luis L. P. daSilva^{1,†}

ABSTRACT

The HIV accessory protein Nef is a major determinant of viral pathogenesis that facilitates viral particle release, prevents viral antigen presentation and increases infectivity of new virus particles. These functions of Nef involve its ability to remove specific host proteins from the surface of infected cells, including the CD4 receptor. Nef binds to the adaptor protein 2 (AP-2) and CD4 in clathrin-coated pits, forcing CD4 internalization and its subsequent targeting to lysosomes. Herein, we report that this lysosomal targeting requires a variant of AP-1 containing isoform 2 of γ -adaptin (AP1G2, hereafter $\gamma 2$). Depletion of the $\gamma 2$ or $\mu 1A$ (AP1M1) subunits of AP-1, but not of $\gamma 1$ (AP1G1), precludes Nef-mediated lysosomal degradation of CD4. In $\gamma 2$ -depleted cells, CD4 internalized by Nef accumulates in early endosomes and this alleviates CD4 removal from the cell surface. Depletion of $\gamma 2$ also hinders EGFR–EGF-complex targeting to lysosomes, an effect that is not observed upon $\gamma 1$ depletion. Taken together, our data provide evidence that the presence of $\gamma 1$ or $\gamma 2$ subunits delineates two distinct variants of AP-1 complexes, with different functions in protein sorting.

KEY WORDS: $\gamma 2$ -adaptin, AP1G1, AP1G2, Receptor downregulation, HIV-1, Nef, MVB

INTRODUCTION

CD4 is a type I transmembrane glycoprotein that, in T cells, functions as a co-receptor, together with the T cell antigen receptor, in the recognition of antigenic peptides bound to major histocompatibility complex (MHC)-II molecules on antigen-presenting cells. Human cells that express CD4, such as T cells and cells of the monocyte and macrophage lineage, are the main targets for human immunodeficiency virus (HIV) infection. Binding of the HIV envelope glycoprotein (ENV) complex to cell surface CD4 is the initial step in virus entry, and is crucial for infection. During the early stages of infection, one of the most abundantly produced HIV proteins is Nef, an accessory protein with no enzymatic activity. Nef is a 27–35-kDa myristoylated protein encoded by the HIV-1, HIV-2 and the simian immunodeficiency virus (SIV) genomes, which is crucial for sustaining robust viral production and promoting disease progression to full-blown AIDS

(Deacon et al., 1995; Gorry et al., 2007; Gulizia et al., 1997; Kestier et al., 1991; Learmont et al., 1999; Oelrichs et al., 1998).

The first function ascribed to Nef was the ability to dramatically reduce cell surface levels of CD4 (Garcia and Miller, 1991; Guy et al., 1987; reviewed by Pereira and daSilva, 2016). Nef-mediated downregulation of CD4 is important to counteract the detrimental effects of high CD4 expression in HIV-infected cells, such as to prevent superinfection (Benson et al., 1993) and to facilitate the release of viral progeny (Cortés et al., 2002; Lama et al., 1999). CD4 downregulation is a highly conserved function of Nef (Mariani and Skowronski, 1993) that is not restricted to natural HIV host cells, but is also active in other animal cell types (Chaudhuri et al., 2007). Nef expression does not alter the levels of CD4 synthesis or the kinetics by which newly synthesized CD4 molecules reach the plasma membrane (Rhee and Marsh, 1994). Instead, Nef accelerates the endocytosis of CD4 and targets the internalized molecules to the lumen of lysosomes for degradation (Aiken et al., 1994; Rhee and Marsh, 1994). To accomplish this, Nef directly binds the cytosolic tail of CD4 (Grzesiek et al., 1996; Preusser et al., 2001; Rossi et al., 1996) and the endocytic adaptor protein 2 (AP-2) (Chaudhuri et al., 2007, 2009; Doray et al., 2007; Lindwasser et al., 2008). This activity promotes the cooperative assembly of a tripartite Nef–AP-2–CD4 complex (Chaudhuri et al., 2009; Ren et al., 2014) that induces the endocytosis of CD4 mediated by clathrin-coated vesicles (CCVs) (Burtey et al., 2007; Greenberg et al., 1997).

CD4 molecules that have been internalized by Nef do not efficiently enter a retrieval pathway from early endosomes back to the plasma membrane, but are instead delivered to late endosomes or multivesicular bodies (MVBs) en route to lysosomes (daSilva et al., 2009; Schaefer et al., 2008). Delivery of transmembrane cargo to the intraluminal vesicles (ILVs) of MVBs, in most cases, requires the recognition of sorting signals by the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRTs). Transmembrane proteins that undergo ILV sorting are typically modified by the covalent attachment of monoubiquitin to their cytosolic tail, which serves as a sorting signal for ESCRTs (Shields and Piper, 2011). Although independent of CD4 ubiquitylation, Nef-mediated depletion of CD4 requires functional ESCRTs (daSilva et al., 2009). Alix (also known as PDCD6IP), an ESCRT-accessory protein, that directly binds Nef (Amorim et al., 2014; Costa et al., 2006; Jesus da Costa et al., 2009), was recently shown to be required for Nef-mediated targeting of CD4 to lysosomes (Amorim et al., 2014). However, depletion of Alix or of Tsg101 (an ESCRT-I component), which inhibits lysosomal targeting of CD4 by Nef, does not impair the Nef-mediated reduction of CD4 surface levels (Amorim et al., 2014; daSilva et al., 2009). This observation suggests that in addition to mediating MVB sorting through Alix, Nef might also promote endosomal retention of CD4 earlier in the pathway to MVBs.

¹Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil. ²Department of Physiology, School of Medicine, and Center for Interdisciplinary Studies of the Nervous System (CISNe), Universidad Austral de Chile, Valdivia 5110566, Chile.

*These authors contributed equally to this work

†Author for correspondence (lldasilva@fmrp.usp.br)

© L.L. P.d., 0000-0003-3558-0087

The adaptor proteins (APs) comprise a family of five heterotetrameric complexes in mammals (Bonifacino, 2014; Robinson, 2015). In addition to AP-2, formed by α , β 2, μ 2 and σ 2 subunits (Table S1), two other AP complexes, AP-1 (γ 1, β 1, μ 1 and σ 1) and AP-3 (δ , β 3, μ 3 and σ 3), are binding partners of Nef (Bresnahan et al., 1998; Chaudhuri et al., 2007; Coleman et al., 2005; Doray et al., 2007; Greenberg et al., 1998; Janvier et al., 2003a,b; Mattera et al., 2011). However, the role of the Nef interaction with AP-1 or AP-3 in CD4 downregulation is poorly understood. AP-1 facilitates CCV-mediated trafficking between the trans-Golgi network (TGN) and endosomes, whereas AP-3 participates in the trafficking to lysosomes and lysosome-related organelles, possibly through clathrin-dependent and clathrin-independent pathways (Robinson, 2015). In addition, it is possible that functional variants of the canonical AP-1, AP-2 and AP-3 complexes exist, given that some of their subunits occur as multiple isoforms encoded by different genes (Table S1). These isoforms include two γ (γ 1 and γ 2), two μ 1 (μ 1A and μ 1B) and three σ 1 (σ 1A, σ 1B and σ 1C) subunits for AP-1; two α subunits for AP-2; and two μ 3 (μ 3A and μ 3B), two β 3 (β 3A and β 3B) and two σ 3 (σ 3A and σ 3B) subunits for AP-3 (Boehm and Bonifacino, 2002). Nef binds to APs through a conserved ‘dileucine-based’ (D/E)xxxL(L/I) consensus motif in the viral protein (Craig et al., 1998; Greenberg et al., 1998), which is recognized by hemi-complexes comprising the γ 1– σ 1, α – σ 2 and δ – σ 3 subunits of the respective AP (Chaudhuri et al., 2007; Coleman et al., 2005; Doray et al., 2007; Janvier et al., 2003a,b). Subsequently, it has been shown that γ 2 is also capable of mediating a σ 1-dependent interaction with Nef (Mattera et al., 2011). However, the capacity of γ 2 to act as a subunit of a functional variant of the canonical (γ 1-containing) AP-1 complex is currently unknown.

To better understand the mechanism by which Nef induces the sustained cellular depletion of CD4, we examined the functional role of the Nef interaction with AP-1. Here, we show that endogenous γ 1 and γ 2 isoforms present partially distinct subcellular distributions, and efficient targeting of CD4 to lysosomes by Nef requires γ 2, but not γ 1. Depletion of γ 2 compromises CD4 degradation and partially restores the surface levels of CD4 in cells expressing Nef. Similarly, μ 1A depletion leads to the impairment of Nef-mediated CD4 degradation, which is not observed upon γ 1-depletion. Our results also suggest that γ 2 expression is essential for efficient lysosomal targeting of EGFR–EGF complexes, whereas γ 1 expression is dispensable in this process. We propose that γ 2 functions as a connector, promoting the incorporation of Nef-associated CD4 molecules into the MVB pathway. Moreover, these findings support the notion that γ 1 and γ 2 play distinct functions in protein trafficking, and provide evidence for the existence of functionally distinct AP-1 complexes, depending on the γ -subunit isoform composition.

RESULTS

Binding of Nef to AP-1 is mediated by the γ 1– σ 1A and γ 2– σ 1A hemi-complexes

Considering the evidence that Nef binds two variants of γ – σ 1A hemi-complexes of AP-1, comprising either the γ 1 or the γ 2-isoforms of the γ -subunit (Mattera et al., 2011), we asked whether these isoforms could play distinct roles in Nef mediated downregulation of CD4. As has been previously shown by yeast three-hybrid (Y3H) assays, the interaction of Nef with γ 1– σ 1A requires a conserved (D/E)xxxL(L/I) signal in Nef (i.e. the ENTSL¹⁶⁵ motif in HIV-1 NL4-3 Nef), and a conserved basic residue in γ 1 at position 15 (Arg¹⁵) (Chaudhuri et al., 2007; Mattera

et al., 2011) (Fig. 1A). The requirement of a basic residue at a similar position has also been shown in the interactions of Nef with the α – σ 2 (α Arg²¹) or the δ – σ 3 (δ Arg²⁶) hemi-complexes of AP-2 and AP-3, respectively (Mattera et al., 2011). However, the sequence requirements for the interaction of Nef with the γ 2– σ 1A hemi-complex have not been described. Given that the structural basis of the interaction of Nef with α Arg²¹ has been previously elucidated (PDB ID 4NEE) (Ren et al., 2014), we evaluated, by homology modeling, whether a similar interaction was predicted between Nef and each of the γ subunits. Similar to the salt bridge interactions of Nef Glu¹⁶⁰ with α Arg²¹ and σ 2 Arg¹⁵ (Ren et al., 2014), the homology models predicted that Nef Glu¹⁶⁰ could participate in salt bridge interactions with either γ 1 Arg¹⁵ and σ 1A Arg¹⁵ (Fig. 1B), or with γ 2 Arg¹⁶ and σ 1A Arg¹⁵ (Fig. 1C). The homology models predicted additional Nef residues participating in interactions with either of the γ – σ 1A hemi-complexes (Fig. S1A,B). In addition, Nef Arg¹⁷⁸ could be accommodated in a concave pocket predicted for each of the γ – σ 1A hemi-complexes (Fig. S1C,D), stabilizing the interactions in a similar manner to the α – σ 2 hemi-complex (Ren et al., 2014).

Our Y3H analysis confirmed that Nef binds to both the γ 1– σ 1A and γ 2– σ 1A hemi-complexes (Fig. 1D,E). Although Nef might interact more weakly with γ 2– σ 1A than with γ 1– σ 1A, as previously observed by Mattera et al. (2011), the interaction was dependent on the ENTSL¹⁶⁵ motif (Fig. 1D) and required σ 1A coexpression (data not shown). This possibly weaker interaction of Nef with γ 2– σ 1A correlates with the fewer number of hydrogen-bond and salt bridge interactions predicted by the homology model (Fig. S1A,B). Next, the importance of γ 2 Arg¹⁶ in the interaction with Nef was analyzed. Similar to upon the substitution of γ 1 Arg¹⁵, we found that the substitution of γ 2 Arg¹⁶ greatly reduced the binding to Nef (Fig. 1D,E). Taken together, our observations suggest that both γ 1 and γ 2 are able to interact with Nef-WT, but not with Nef-LL/AA (where L164 and L165 are mutated into alanine residues), and that Arg¹⁵ and Arg¹⁶ in γ 1 and γ 2, respectively, contribute to stabilize these interactions.

Nef requires γ 2, but not γ 1, for efficient targeting of CD4 to lysosomes

To comparatively assess the function of the Nef interaction with AP-1 through γ 1 or γ 2, we tested, by performing RNA interference (RNAi) studies, whether the specific depletion of either γ 1 or γ 2 affected Nef-induced downregulation of CD4 in HeLa cells. Knockdown (KD) of γ 1 or γ 2, mediated by small interfering RNA (siRNA), resulted in 77.9% ($\pm$ 4.7, mean $\pm$ s.e.m., n =4) and 71.9% ($\pm$ 2.3, n =4) reduction in their expression levels, respectively (Fig. 2A). Moreover, siRNA directed to either γ 1 or γ 2 did not affect the expression levels of the other isoform (Fig. 2A). Immunoblot analysis confirmed that the expression of Nef decreased the total levels of CD4 (Fig. 2A,B). Nef-LL/AA or Nef-L/A (L¹⁶⁵ mutated to an alanine residue) mutants were used as negative controls. These mutants did not interact with γ 1– σ 1, α – σ 2, δ – σ 3 (Chaudhuri et al., 2007; Mattera et al., 2011) or γ 2– σ 1 (Fig. 1D) hemi-complexes, and failed to reduce the total cell levels of CD4 (Fig. 2A,B), as previously shown (daSilva et al., 2009). The KD of γ 1 did not significantly alter CD4 depletion by Nef-WT (Fig. 2A,B). In contrast, γ 2 KD increased the steady state levels of CD4 in control conditions (i.e. in Nef-L/A-expressing cells) and impaired Nef-induced depletion of CD4 (Fig. 2A,B). Treatment of cells with an alternative γ 2 siRNA sequence (herein termed γ 2 siRNA #2), which produced a 61.7% ($\pm$ 3.8) reduction in γ 2 expression (Fig. S2A,B) also impaired Nef-mediated CD4 depletion (Fig. S2C,D).

Fig. 1. Interaction of HIV-1 Nef with $\gamma 2$ demonstrated by Y3H analysis. (A) Schematic representation of the domain organization of $\gamma 1$ and $\gamma 2$ subunits of AP-1, highlighting in red the putative Nef-interacting basic residues Arg¹⁵ (R15) and Arg¹⁶ (R16) of $\gamma 1$ and $\gamma 2$, respectively. (B,C) Homology models of Nef bound to the $\gamma 1$ – $\sigma 1A$ (B) or $\gamma 2$ – $\sigma 1A$ (C) hemicomplexes of AP-1. The insets highlight the salt bridge interaction of Nef Glu¹⁶⁰ (E160), either with $\gamma 1$ Arg¹⁵ (R15 in magenta) and $\sigma 1A$ Arg¹⁵ (R15 in yellow) (B), or with $\gamma 2$ Arg¹⁶ (R16 in red) and $\sigma 1A$ Arg¹⁵ (R15 in yellow) (C), and the position of Leu¹⁶⁴ and Leu¹⁶⁵ of the Nef dileucine motif (B,C). (D,E) Y3H analysis of the interaction between Nef and AP-1 hemi-complexes. Co-transformants were counted and replica plated onto +His medium, as growth and loading controls. Growth on –His/–Met medium indicates interaction between the assayed proteins. The images shown are representative of three independent experiments. WT, wild type; LL/AA, mutant in which L¹⁶⁴ and L¹⁶⁵ were replaced by alanine residues.

Moreover, the degradation of CD4 induced by two other HIV-1 Nef alleles (variants NA7 and 248), and by the SIV Nef variant SIVmac293, previously shown to downregulate CD4 (Chaudhuri et al., 2007), was also inhibited in $\gamma 2$ KD cells (Fig. S2E). Taken together, these results indicate that $\gamma 2$ is required for the process of Nef-mediated targeting of CD4 to lysosomes, and also for normal CD4 turnover.

AP-1 is thought to participate in the transport of mannose-6-phosphate receptors (MPRs), which mediate sorting of acid hydrolases to lysosomes (reviewed by Ghosh et al., 2003). To rule out that the impairment of Nef-mediated degradation of CD4 in $\gamma 2$ KD cells was due to a block in the delivery of acid hydrolases to lysosomes, we monitored lysosomal processing and secretion of the acid hydrolase cathepsin D (catD) by pulse-chase analysis. Cells

Fig. 2. CD4 downregulation mediated by HIV-1 Nef requires $\gamma 2$, but not $\gamma 1$. (A) HeLa cells treated with control, $\gamma 1$ or $\gamma 2$ siRNA, were transfected with pCMV-CD4 together with empty pCIneo, pCIneo-Nef-L/A or pCIneo-Nef-WT. After 20 h, cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. *, non-specific protein bands. (B) The CD4 signal intensity for each condition in A was determined using the Image Lab Software (Biorad), and is expressed as the percentage of CD4 signal from cells transfected with empty pCIneo in siRNA control condition. Bars represent the mean $\pm$ s.e.m. ($n=4$). The percentage reduction of CD4 between Nef-L/A and Nef-WT for each siRNA condition is shown above the black bars. (C) Cells were treated as in A, transfected with pCMV-CD4 together with pNef-LL/AA.IRES.GFP or pNef-WT.IRES.GFP, and analyzed for cell surface CD4 by FACS. (D) Bars represent surface levels of CD4 (mean fluorescence intensity, MFI) in cells transfected with pNef-WT.IRES.GFP, relative to levels in cells transfected with pNef-LL/AA.IRES.GFP. The average surface levels of CD4 in Nef-LL/AA cells treated with control siRNA was set to 100%. The percentage reduction of surface CD4 between Nef-L/A and Nef-WT for each condition is shown. The data represent the mean $\pm$ s.e.m. ($n=4$). *** $P<0.0005$; ns, not significant (one-way ANOVA with Bonferroni's corrections).

were metabolically labeled with [35 S]methionine-cysteine for 20 min, and after a 5-h chase, catD species were isolated by immunoprecipitation from both cell extracts and culture medium and resolved by SDS-PAGE and fluorography (Fig. S3A). In control cells, the precursor catD (pro-catD) was cleaved to generate either an intermediate (int-catD) or a mature lysosomal form (m-catD), with only trace amounts of pro-catD being secreted into the medium over the period of 5 h (Fig. S3). Depletion of $\gamma 1$ led to the increased secretion of pro-catD into the medium and a consequent reduction in the amount of intracellular m-catD (Fig. S3), indicating a partial impairment of transport to lysosomes, as previously observed by Hirst et al., (2009). In $\gamma 2$ KD cells, the ratio of intracellular m-catD and secreted pro-catD was similar to in control cells (Fig. S3A). We further analyzed the effect of $\gamma 2$ KD in the subcellular distribution of catD by

immunofluorescence confocal microscopy. In control cells, catD exhibited its characteristic localization at vesicular structures scattered throughout the cytoplasm (Fig. S3B). Although $\gamma 1$ KD led to a greatly reduced staining for catD, the staining and distribution pattern for catD in $\gamma 2$ KD cells were similar to in cells treated with control siRNA (Fig. S3B,C). These data suggest that deficient lysosomal delivery of hydrolases does not account for the reduced CD4 degradation in $\gamma 2$ KD cells. Instead, $\gamma 2$ is likely to play a more direct role in targeting Nef-internalized CD4 to lysosomes. Moreover, these results show that although $\gamma 1$ function is impaired in our $\gamma 1$ KD cells, this impairment is not sufficient to preclude CD4 degradation induced by Nef (Fig. 2A,B). In fact, there is evidence that the Golgi-localized, γ -ear containing, ARF-binding proteins (GGAs) help to mediate sorting of lysosomal hydrolases and could compensate for the lack of $\gamma 1$ (Hirst et al., 2009).

Knockdown of $\gamma 2$ alleviates surface depletion of CD4 by Nef

To investigate the differential requirements of $\gamma 1$ and $\gamma 2$ in the downregulation of CD4 by Nef, the levels of surface CD4 in cells expressing Nef were analyzed. Quantitative analyses by flow cytometry showed that the levels of CD4 on the surface of HeLa cells expressing Nef-WT were reduced by 88.8% (± 4.8 ; mean $\pm$ s.e.m.), when compared to control Nef-LL/AA cells (Fig. 2C,D). A smaller, 33.8% (± 3.5), reduction in surface levels of CD4 was observed in $\gamma 2$ KD cells upon expression of Nef-WT (Fig. 2C,D), indicating a partial impairment in Nef activity. Interestingly, the surface levels of CD4 were increased $\sim$ twofold in control (Nef-LL/AA) cells depleted of $\gamma 2$, confirming our previous observation that $\gamma 2$ is required for normal CD4 turnover (Fig. 2A,B). As expected, depletion of $\gamma 1$ did not affect CD4 downregulation by Nef (Fig. 2C,D). Taken together, the results shown in Fig. 2 indicate that $\gamma 2$ is required for efficient targeting of CD4 to lysosomes by Nef. In contrast, $\gamma 1$ expression is dispensable for CD4 downregulation by Nef, as previously reported (Leonard et al., 2011).

Additional evidence that $\gamma 2$ is required for efficient Nef-mediated targeting of CD4 to lysosomes was obtained by immunofluorescence microscopy analysis. As expected, Nef caused a dramatic redistribution of CD4 from the plasma membrane (Fig. 3A–C) to cytoplasmic vesicular structures, which were mostly localized at a juxtanuclear region (Fig. 3D–F). Although $\gamma 2$ presented a more dispersed localization in control-transfected cells (Fig. 3A–C), in cells expressing Nef some of the CD4-positive structures also contained $\gamma 2$ (Fig. 3D–G; Table S2). In contrast, the pattern of CD4 redistribution mediated by Nef was severely modified by the depletion of $\gamma 2$, and CD4 was detected at puncta distributed throughout the cytoplasm (Fig. 3H–M). A similar effect was observed when the $\gamma 2$ siRNA #2 was used to deplete $\gamma 2$ (Fig. S4). In $\gamma 2$ -depleted cells, expression of Nef led to an increase (from $\sim 27\%$ to $\sim 70\%$) in colocalization of CD4 with EEA1, a peripheral membrane protein recruited to early endosomes (Fig. 4A–F,M; Table S2), suggesting that CD4 accumulates in pre-lysosomal compartments. Moreover, EEA1-positive endosomes appeared slightly enlarged and more dispersed in $\gamma 2$ KD cells.

Next, we asked whether this accumulation in early endosomes could result in a reduced detection of CD4 in lysosomes of Nef cells. To this end, we treated cells with the fluorescent dye LysoTracker, a lysosomal marker that specifically accumulates within acidic compartments (Lemieux et al., 2004). Acidic vesicles are clearly detected in control and $\gamma 2$ KD cells (Fig. 4G–L), indicating that $\gamma 2$ depletion does not block vesicular acidification. Although, downregulated CD4 was occasionally detected in the periphery of these acidic vesicles in $\gamma 2$ KD cells (Fig. 4J–L, see inset), we were unable to observe considerable differences in the amount of CD4 staining that overlapped with LysoTracker in $\gamma 2$ KD cells expressing Nef, when compared to cells treated with control siRNA (Fig. 4M; Table S2). It is possible that proteolytic degradation prevents accumulation of CD4 within lysosomes and undermines detection by immunofluorescence microscopy (daSilva et al., 2009). Taken together, these results further support the notion that $\gamma 2$ is required for efficient downregulation of CD4 by Nef.

$\gamma 2$ is part of an AP-1 complex variant involved in Nef-mediated targeting of CD4 to lysosomes

The differential effects of $\gamma 1$ and $\gamma 2$ depletion on CD4 downregulation by Nef prompted the investigation of whether the role of $\gamma 2$ in Nef-mediated CD4 trafficking is dependent on another AP-1 complex subunit. To this end, we reduced the expression of the $\mu 1A$ subunit of AP-1 in HeLa cells with siRNA (a 91.1 $\pm$ 6.2%

depletion was achieved; mean $\pm$ s.e.m., $n=4$; Fig. 5A). Interestingly, depletion of $\mu 1A$ led to a strong reduction in the cellular levels of both $\gamma 1$ and $\gamma 2$ (77.9 $\pm$ 4.7% and 71.9 $\pm$ 2.3% depletion of $\gamma 1$ and $\gamma 2$, respectively; Fig. 5A). This suggests that depletion of $\mu 1A$ compromises the stability of both γ subunit isoforms, and that they might mostly occur as complexes with $\mu 1A$ in cells. Next, we carried out analyses, in $\mu 1A$ KD cells, of either the total levels of CD4, as assessed by immunoblotting (Fig. 5A,B), or the cell surface levels of CD4, as assessed by FACS (Fig. 5C,D). Depletion of $\mu 1A$ caused a partial block in the Nef-mediated reduction of total levels of CD4 (Fig. 5A,B). However, this inhibitory effect was not as strong as that observed upon $\gamma 2$ depletion (compare with Fig. 2A,B), perhaps due to pleiotropic effects resulting from indirect co-depletion of $\gamma 1$ (see Discussion). In contrast, $\mu 1A$ depletion did not alter the reduction in the surface levels of CD4 mediated by Nef (Fig. 5C,D). Nonetheless, these results support the notion that $\gamma 2$ is expressed as a complex with $\mu 1A$ (Mattera et al., 2011), and that $\mu 1A$ expression is also required for efficient degradation of CD4 induced by Nef. To investigate whether interaction of Nef with the AP-1 complex during CD4 downregulation occurs in subcellular sites where $\gamma 2$ is present, we used bimolecular fluorescence complementation (BiFC). This technique has been broadly used to study Nef dimerization (Poe and Smithgall, 2009; Poe et al., 2014) and the interaction of Nef with host cell proteins (Amorim et al., 2014; Dikeakos et al., 2012; Dirk et al., 2015). To this end, we generated constructs encoding Nef and $\mu 1A$ fused to the N- or C-terminal halves of the Venus fluorescent protein, respectively (Nef-VNt and $\mu 1A$ -VCt). Importantly, it has been demonstrated that $\mu 1A$ C-terminally tagged with epitopes or fluorescent proteins, assembles into the AP-1 complex and displays the expected subcellular localization (Guo et al., 2013).

HeLa cells co-transfected with CD4, Nef-VNt and $\mu 1A$ -VCt plasmids showed a punctate pattern of Venus fluorescence distribution, mostly localized in the juxtanuclear region (Fig. 5E). Approximately 57% of the $\gamma 2$ labeling overlapped with the BiFC signal (Fig. 5E–K; Table S2), and $\sim 73\%$ of the structures that presented signal for both BiFC and CD4 also stained for $\gamma 2$ (Fig. 5L). Moreover, no Venus fluorescence was detected when the Nef-LL/AA-VNt and $\mu 1A$ -VCt constructs were co-transfected (result not shown), implying that BiFC was dependent on the ENTSSL¹⁶⁵ motif. Taken together, the results indicate that a variant of AP-1 comprising $\gamma 2$, but not $\gamma 1$, is required for efficient targeting of CD4 to lysosomes by Nef.

Impairment of the ESCRT pathway leads to colocalization of $\gamma 2$ and CD4 in enlarged endosomes upon Nef expression

To gain insights into the role of $\gamma 2$ in the downregulation of CD4 by Nef, we sought to determine the subcellular localization of $\gamma 2$. Initially, we directly compared the subcellular distribution of endogenous $\gamma 1$ and $\gamma 2$. Immunofluorescence microscopy showed that although a considerable fraction ($\sim 34\%$) of $\gamma 2$ colocalized with $\gamma 1$, most of the $\gamma 2$ -positive structures were clearly separated from the $\gamma 1$ labeling (Fig. 6A–D; Table S2). This differential pattern suggests that $\gamma 1$ and $\gamma 2$ are recruited to distinct subcellular structures, and that they might mediate protein transport from different locations. Further colocalization analyses revealed a partial colocalization of $\gamma 2$ with endosomal markers. Approximately 26% of $\gamma 2$ labeling localized to EEA1-positive structures (Fig. 6E–G,D; Table S2). A greater proportion of $\gamma 2$ staining ($\sim 42\%$) colocalized with transferrin receptor (TfR) (Fig. 6H–J,D; Table S2), a transmembrane protein that cycles between the plasma membrane and the endosomal system, and at

Fig. 3. Depletion of $\gamma 2$ impairs the redistribution of CD4 to the juxtanuclear region by HIV Nef. HeLa cells treated with control siRNA (A–F) or siRNA for $\gamma 2$ (H–M) were transfected with pCMV.CD4 and empty pCIneo vector (A–C and H–J) or pCIneo.Nef-WT (D–F and K–M). After 20 h, cells were fixed, permeabilized and stained for CD4 (red channel) and $\gamma 2$ (green channel). The color yellow in the merged images indicates colocalization. Scale bars: 10 μ m. The insets show the boxed areas at a 3.5 $\times$ magnification. (G) Bar graph showing the mean $\pm$ s.e.m. of the Manders' overlap coefficient between CD4 and $\gamma 2$ signals in the conditions shown in A–C and D–F. *** $P < 0.0005$ (two-tailed paired t -test).

steady state, is mostly localized in early and recycling endosomes (Grant and Donaldson, 2009). Moreover, $\sim 17\%$ of the $\gamma 2$ signal showed colocalization with that of CD63, a late endosome and lysosome protein (Fig. 6K–M,D; Table S2). In contrast, less than 0.05% of the $\gamma 2$ signal overlapped with that of cytochrome c , a mitochondrial protein, serving as reference for absence of colocalization (Fig. 6N–P,D; Table S2). These findings indicate that a portion of $\gamma 2$ is recruited to membranes of endosomal

compartments. In fact, it has been shown that $\gamma 2$ interacts with components of the ESCRT machinery and might play a role in protein sorting to late endosomes (Döring et al., 2010). Because Nef-mediated degradation of CD4 is ESCRT-dependent and requires CD4 targeting to the MVB pathway (daSilva et al., 2009), we hypothesized that $\gamma 2$ could facilitate such targeting. To investigate this possibility, we overexpressed GFP-tagged HRS (also known as HGS), which is a component of the ESCRT-0

Fig. 4. Depletion of $\gamma 2$ induces accumulation of CD4 in early endosomes in cells expressing Nef. HeLa cells were treated with control siRNA (A–C and G–I) or siRNA for $\gamma 2$ (D–F and J–L), and then co-transfected with pCMV.CD4 and pCNeo.Nef-WT. (A–F) After 16 h, cells were fixed, permeabilized and stained for CD4 (red channel) and EEA1 (green channel). (G–L) Cells were incubated with LysoTracker (green channel) and then fixed, permeabilized and stained for CD4. Yellow in the merged images indicates colocalization. Scale bars: 10 μ m. The insets show the boxed areas at a 3 $\times$ magnification. (M) Bars represent the mean $\pm$ s.e.m. of the Manders' colocalization coefficient between CD4 and the indicated markers signals in control or $\gamma 2$ KD cells. * $P < 0.05$; *** $P < 0.0005$; ns, not significant (two-tailed paired t -test).

complex that initiates recruitment of the ESCRT machinery in early endosomes (Williams and Urbé, 2007). Overexpression of HRS negatively perturbs the ESCRT pathway, promoting accumulation of ESCRT-I in early endosomes that become enlarged (Bache et al., 2003; Bishop et al., 2002). Overexpression of cytosolic GFP did not seem to alter the

distribution of $\gamma 2$ and CD4 downregulated by Nef (Fig. 7A–D). However, in HRS–GFP-expressing cells, CD4 internalized by Nef was detected in enlarged endosomes (Fig. 7E–L). Under these conditions, a large proportion of $\gamma 2$ signal (~75%) was detected in structures that were positive for both CD4 and HRS–GFP (Fig. 7M). This result provides additional support to the notion

Fig. 5. Depletion of μ 1A partially inhibits CD4 degradation induced by Nef. (A) HeLa cells treated with control siRNA or siRNA for μ 1A were transfected with pCMV-CD4 and pCIneo-Nef- L/A or pCIneo-Nef-WT. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. *, non-specific protein bands. (B) The CD4 signal intensity is expressed as described for Fig. 2B. Bars represent the means $\pm$ s.e.m., ($n=4$). The percentage of reduction in the levels of CD4 in Nef-WT cells relative to Nef-L/A cells for each siRNA condition is also shown. (C) Cells were treated as in A and transfected with pCMV-CD4-GFP, together with either pNef-LL/AA.IRES.GFP or pNef-WT.IRES.GFP, and analyzed for cell surface CD4 by FACS. (D) The bar graph represents surface levels of CD4 (MFI values from FACS histogram plots) relative to levels in cells transfected with pNef-LL/AA.IRES.GFP in control siRNA conditions (100%). Data are the mean $\pm$ s.e.m. ($n=3$). (E–K) Cells were transfected with pCMV-CD4 together with pNef-VNt and μ 1A-VCI, and after 8 h the cells were fixed, permeabilized and stained for CD4 and γ 2. Scale bar: 10 μ m. (L) Bar graph showing the mean $\pm$ s.e.m. ($n=5$) of the Manders' coefficient of γ 2 signal colocalizing with the overlapping CD4 and BiFC signals before (gray bar) and after (black bar) rotating CD4 and BiFC images by 90°. * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.0005$; ns, not significant (one-way ANOVA with Bonferroni's corrections for B,D; two-tailed paired t -test for L).

Fig. 6. γ 2-adaptin partially colocalizes with protein markers of early and recycling endosomes. (A–L) HeLa cells grown on coverslips were fixed, permeabilized and stained for γ 2 (green channel) and γ 1 (A–C), EEA1 (E–G), TfR (H–J), CD63 (K–M) or cytochrome c (CYT-C; N–P) (red channel). The color yellow in the merged images indicates colocalization. Scale bars: 10 μ m. (D) Represents the mean $\pm$ s.e.m. of Manders' colocalization coefficient between γ 2 and respective protein signals. *** P < 0.0005 (two-tailed paired t -test).

that γ 2 could be recruited to endosomal compartments to facilitate the efficient targeting of CD4 to the MVB pathway by Nef.

Requirement of γ 2 for receptor downregulation through the canonical MVB pathway

The results shown above indicated a requirement for γ 2 in Nef-mediated targeting of CD4 to lysosomes. We have previously shown that this process involves ESCRT-dependent targeting of CD4 to the MVB pathway (Amorim et al., 2014; daSilva et al., 2009). Signaling receptors such as the EGF receptor (EGFR) are also

targeted to the MVB pathway after they undergo signal-mediated endocytosis (Felder et al., 1990). To explore whether γ 2 has a role in this receptor downregulation pathway, we performed uptake experiments with fluorescent EGF (Alexa-Fluor-488-EGF). This approach allows monitoring the kinetics of lysosomal delivery of internalized EGF. HeLa cells treated with control siRNA or siRNA for γ 1 or γ 2, were serum starved and incubated with Alexa-Fluor-488-EGF for 5 min and chased for 30 or 120 min at 37°C. In control cells (Fig. 8A,C,E) and also in γ 1-depleted cells (Fig. 8B,E), Alexa-Fluor-488-EGF labeling was drastically reduced upon a

Fig. 7. HRS-GFP colocalizes with CD4 and $\gamma 2$ in cells expressing Nef. (A–H) HeLa cells were transfected with pCMV-CD4 and pCneo-Nef-WT with either pEGFP (A–D) or pEGFP-HRS (E–L) (green channel). After 20 h, cells were fixed, permeabilized and stained for CD4 (red channel) and $\gamma 2$ (cyan channel). Scale bars: 10 μ m. The insets represent the boxed areas at a 6 $\times$ magnification. (M) Bar graph showing the mean $\pm$ s.e.m. ($n=5$) of the Manders' colocalization coefficient between the $\gamma 2$ signal and the overlapping CD4 and HRS-GFP signal before (gray bar) and after (black bar) rotating CD4 and HRS-GFP images by 90°. *** $P<0.0005$ (two-tailed paired t -test).

120-min incubation, indicating delivery to an acidic compartment, in which EGF is degraded. Notably, in $\gamma 2$ -depleted cells a substantial amount of fluorescent EGF remained detectable after 120 min of incubation (Fig. 8D,E). This data indicates that $\gamma 2$ is required for efficient degradation of internalized EGF, a process that normally depends on delivery of EGFR to MVBs. To further confirm the participation of $\gamma 2$ in this pathway, we assayed for EGF-induced degradation of EGFR in control and $\gamma 2$ KD HeLa cells. We found that $\gamma 2$ -depletion resulted in a significant reduction in the kinetics of EGFR degradation upon EGF stimulation (Fig. 8F,G). Taken together, the results suggest that $\gamma 2$ expression is required for efficient delivery of EGFR-EGF complexes to the MBV pathway, and could also facilitate targeting of CD4 to this pathway by Nef. In this model, Nef interacts with AP-1 through the $\gamma 2$ - $\sigma 1$ hemi-

complex to accelerate targeting of CD4 to lysosomes, in the same manner as it interacts with the α - $\sigma 2$ hemi-complex of AP-2 to promote CD4 endocytosis.

DISCUSSION

Nef interacts with AP-1 through either the $\gamma 1$ - $\sigma 1$ or the $\gamma 2$ - $\sigma 1$ hemi-complexes (Mattera et al., 2011; Fig. 1). However, prior to our study, the functional relevance of Nef-AP-1 interaction in the downregulation of CD4 was unknown. In the present study, we confirmed the interaction of Nef with $\gamma 2$ - $\sigma 1$, and show that this binding requires a conserved D/ExxxL(L/I) motif in Nef (Fig. 1). The results of this study also demonstrate that efficient CD4 downregulation by Nef requires the function of $\gamma 2$, whereas $\gamma 1$ is dispensable (Fig. 2; Fig. S2).

Fig. 8. The EGFR–EGF degradation pathway requires $\gamma 2$, but not $\gamma 1$. (A–D) HeLa cells transfected with the indicated siRNA were incubated with Alexa-Fluor-488–EGF (green channel) during the indicated periods. Cells were fixed, permeabilized and stained for $\gamma 1$ (A,B) or $\gamma 2$ (C,D) (red channel). The images are representative of four independent experiments. Scale bars: 10 μ m. (E) The MFI of Alexa Fluor 488 puncta was determined for ten individual cells, for each condition shown in A and C, B or D, after a 30- or 120-min chase using ImageJ. The averaged MFI for control, $\gamma 1$ or $\gamma 2$ siRNA treated cells at the 30-min chase time-point was set to 100%. Values are the relative averaged MFI $\pm$ s.e.m. ($n=4$). (F,G) Cells treated as in A–D were incubated with EGF, surface biotinylated and further incubated at 37°C during the indicated periods. The biotinylated surface proteins (Surface) were probed using an anti-EGFR antibody. Input represents 10% of total cell lysate. (G) The intensity of the EGFR signal was quantified using the Image Lab Software, and was expressed in relation to EGFR signal at time 1 h, for either control or $\gamma 2$ KD cells. Values are the relative mean $\pm$ s.e.m. ($n=3$). * $P<0.05$; ** $P<0.005$; *** $P<0.0005$; ns, not significant (one-way ANOVA with Bonferroni's corrections).

Upon Nef- and AP-2-mediated internalization, CD4 is delivered to early endosomes and finally to lysosomes for degradation. A major event in this process involves targeting of CD4 to the ILVs of MVBs (daSilva et al., 2009; Schaefer et al., 2008) in a CD4-

ubiquitylation-independent manner, which depends on the ESCRT machinery (daSilva et al., 2009) and is mediated by the direct interaction of Nef with Alix (Amorim et al., 2014). Although KD of Alix or Tsg101 (ESCRT-I) blocks CD4 degradation induced by

Nef, it does not alleviate depletion of cell surface CD4 (Amorim et al., 2014; daSilva et al., 2009). This suggests that Nef- and Alix-mediated targeting of CD4 to ILVs occurs after CD4 molecules are already segregated away from endosomal domains that are engaged in recycling to the plasma membrane. Our findings that $\gamma 2$ KD leads to the accumulation of CD4 in early endosomes and impairs cell surface depletion of CD4 mediated by Nef (Figs 2 and 4), indicate that $\gamma 2$ activity is required in a step prior to sorting of CD4 into the degradative MVB pathway. Consistent with the role of $\gamma 2$ in targeting internalized CD4 to late endosomes, most of the endogenous $\gamma 2$ staining is located in early and recycling endosomes (Fig. 6; Table S2), and CD4 mostly colocalizes with $\gamma 2$ in cells expressing Nef (Fig. 3). Moreover, upon artificially stabilizing ESCRT-I in early endosomes by overexpression of HRS (Bache et al., 2003; Bishop et al., 2002), internalized CD4 accumulates in enlarged HRS–GFP-positive endosomes, where colocalization with $\gamma 2$ is prominent (Fig. 7).

Our results also demonstrate that depletion of $\gamma 2$, but not $\gamma 1$, slows down the degradation of EGF–EGFR complexes (Fig. 8), the prototype cargo of the canonical MVB pathway. Indeed, a role in endosome to lysosome maturation or trafficking has been proposed for $\gamma 2$ by other authors (Döring et al., 2010; Rost et al., 2008). In particular, it has been demonstrated that $\gamma 2$ associates with subunits of ESCRT-I and -III, and that $\gamma 2$ depletion enhances HIV particle release, likely by inhibiting lysosome-mediated clearance of HIV Gag protein (Döring et al., 2010). We conclude that $\gamma 2$ is an important factor in the targeting of endocytosed proteins to the degradative MVB pathway.

AP-1 is potentially the most diverse AP complex with two γ ($\gamma 1$ and $\gamma 2$), two μ ($\mu 1A$ and $\mu 1B$) and three σ ($\sigma 1A$, $\sigma 1B$ and $\sigma 1C$) isoforms expressed in mammals (Boehm and Bonifacino, 2001), which could hypothetically give rise to twelve complexes. With the exception of $\mu 1B$, which is specifically expressed in epithelial cells (Ohno et al., 1999), all the other isoforms are ubiquitously expressed in different cell types. Both $\mu 1A$ and $\mu 1B$ can assemble in AP-1 complexes (Fölsch et al., 2001; Guo et al., 2013), and this enables AP-1 variants to mediate sorting of a broader range of cargos (Bonifacino, 2014; Guo et al., 2013). Our data indicate that the γ isoforms also endow AP-1 complexes with different properties. This notion is supported by previous reports showing that knockout of the $\gamma 1$ gene in mice causes early embryonic lethality (Zizioli et al., 1999), and KD of $\gamma 1$ is sufficient to cause missorting of specific proteins (Fariás et al., 2012; Hirst et al., 2012). In addition, $\gamma 1$ – $\sigma 1$ and $\gamma 2$ – $\sigma 1$ hemi-complexes display different binding affinities for D/ExxxL(L/I) sorting signals, depending on the context of the signal (Mattera et al., 2011), suggesting distinct cargo recognition specificities.

Determinants within the γ and $\beta 1$ subunits are thought to define the membrane localization of AP-1 (Austin et al., 2002; Heldwein et al., 2004; Ren et al., 2013; Wang et al., 2003). Therefore, we speculate that $\gamma 1$ and $\gamma 2$ may mediate recruitment of AP-1 variants to distinct locations within cells. Corroborating this notion, the direct comparison of endogenous $\gamma 1$ and $\gamma 2$ subcellular distribution has shown that these proteins are recruited mostly to distinct intracellular membrane domains (Fig. 6; Table S2). The demonstration that $\gamma 2$ can interact with the other three AP-1 subunits (Mattera et al., 2011; Takatsu et al., 1998) indicates that $\gamma 2$ is capable of forming an variant AP-1 complex. However, so far, no direct evidence has distinguished whether $\gamma 2$ exerts its functions as a monomer or as part of an AP-1 complex. In the present study, the stability of both γ -subunit isoforms was compromised in the absence of $\mu 1A$ (Fig. 5), indicating that $\gamma 1$ and $\gamma 2$ are mostly expressed as part of an AP-1

complex. In fact, it has been previously demonstrated that in the absence of one of the subunits, the respective AP complex becomes unstable and disassembles, resulting in decreased levels of the other subunits (DaSilva et al., 2016; Meyer et al., 2000; Motley et al., 2003; Peden et al., 2002). Moreover, as for $\gamma 1$, interaction of Nef with $\gamma 2$ absolutely requires co-expression of the $\sigma 1$ subunit (Mattera et al., 2011; and our results, data not shown). Finally, we show that depletion of $\mu 1A$ partially mimics $\gamma 2$ depletion for the impairment of Nef-mediated degradation of CD4 (Figs 2 and 5). However, the inhibitory effect of $\mu 1A$ KD was weaker when compared to $\gamma 2$ KD (Figs 2 and 5). This weakened effect could be the consequence of co-depletion of AP-1 complexes comprising $\gamma 1$, as the absence of both AP-1 variants might favor pathways mediated by other adaptor proteins that utilize common co-factors, such as AP-2. Specifically, it has been previously proposed that AP-2 depletion enhances AP-1-dependent pathways (Lubben et al., 2007). Therefore, $\gamma 2$ is most likely part of an AP-1 complex variant involved in Nef-mediated targeting of CD4 to lysosomes, a notion that is further confirmed by BiFC assays showing that $\gamma 2$ labeling greatly overlaps with signals for Nef interaction with AP-1 ($\mu 1A$) in CD4-positive structures (Fig. 5L–E).

In summary, our results demonstrate that efficient targeting of CD4 for degradation in lysosomes by Nef requires the Nef interaction partner $\gamma 2$ -adaptin. Our results also provide evidence that $\gamma 2$ is a subunit of a new AP-1 variant, which functions in an endocytic pathway leading to late endosomes and lysosomes, and is functionally distinct from the canonical AP-1 complex containing the $\gamma 1$ subunit. Because Nef plays a decisive role in HIV-1 pathogenesis, through the downregulation of host surface proteins (Pereira and daSilva, 2016; Sugden et al., 2016), it is important to test the role of $\gamma 2$ in the downregulation of other Nef targets.

MATERIALS AND METHODS

Homology modeling and structural analysis

Molecular models of Nef bound to either the $\gamma 1$ – $\sigma 1A$ or the $\gamma 2$ – $\sigma 1A$ (AP-1) hemi-complexes were generated by homology modeling with YASARA Structure's homology modeling module (Krieger et al., 2009). As a model template, we used Nef bound to the α and $\sigma 2$ subunits of AP-2 (PDB ID 4NEE) (Ren et al., 2014). The amino acid sequence of the HIV-1 isolate HXB2 Nef protein (UniProtKB ID P04601) and the human amino acid sequence of $\gamma 1$ (UniProtKB ID O43747), $\gamma 2$ (UniProtKB ID O75843) and $\sigma 1A$ (UniProtKB ID P61966) were used. The resulting refined models were analyzed on the PDBePISA server (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/pistart.html>) (Krissinel, 2010) for the identification of interfacing residues, as well as of residues forming hydrogen bonds, disulfide bonds or salt bridges. Structural figures were prepared with MacPymol (<https://www.pymol.org/>).

Expression plasmids

The mammalian expression vectors: pCMV.CD4, pCIneo.Nef-WT, pCIneo.Nef-LL/AA (encoding HIV-1 NL4-3 Nef-WT and the dileucine mutant) and the pIRES2.eGFP based vectors (encoding HIV-1 NL4-3, NA7, 248 or SIVmac239 Nef alleles) were as described by Chaudhuri et al. (2007). For pHRS-EGFP, the HRS cDNA was amplified from pCIneo3xHA-HRS and cloned into a pEGFP-C vector (Clontech, Palo Alto, CA). pGADT7 (Clontech) encoding either human $\gamma 2$ or mouse $\gamma 1$, and the pBridge (Clontech) encoding NL4-3 Nef and rat $\sigma 1A$ (pBridge.Nef-Wt. $\sigma 1A$), were as described previously (Mattera et al., 2011). The Nef-WT cDNA in pBridge.Nef-Wt. $\sigma 1A$ was replaced with the Nef-LL/AA cDNA from pCIneo.Nef-LL/AA to generate the pBridge.Nef-LL/AA. $\sigma 1A$ plasmid. For BiFC experiments, we used the pNef-VNT plasmid encoding NL4-3 Nef fused to the N-terminal half of Venus protein (VNT, residues 1 to 158) (Amorim et al., 2014); and the $\mu 1A$ -VCt plasmid, generated as follows: the mouse $\mu 1A$ open reading frame (ORF) was amplified from pCIneo $\mu 1A$ -HA (Guo et al., 2013) and used to replace the leucine zipper (LZ) sequence in the pcDNA3.1/Zeo-LZ-VCt (MacDonald et al., 2006). This resulted in the

μ 1A C-terminal appendage of a spacer sequence (GGGGSGGGSSG), followed by the VCt sequence (residues 159 to 239 of Venus protein).

Yeast three-hybrid analyses

Y3H assays were performed as previously described (Mattera et al., 2011). Briefly, *Saccharomyces cerevisiae* cells (HF7c strain) were transformed with pairs of pBridge and pGADT7 vectors. Double transformants were selected on dropout agar plates lacking Leu, Trp, and Met, but containing His (+His). For colony growth assays, pooled colonies from each transformation were resuspended in water, counted using an hemocytometer, and tenfold serial dilutions from 10^4 cells/5 μ l were prepared, and 5 μ l of each cell suspension were dotted on: (1) +His plates (loading control); and (2) plates lacking leucine, tryptophan, methionine and histidine (–His/–Met), with or without 0.2 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT), a competitive inhibitor of the His3 protein.

Cell culture, transfections and RNA interference

HeLa CCL-2 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA), grown as previously described (Amorim et al., 2014), were transiently transfected with the indicated plasmids using Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific). The siRNA were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO) as nucleotide duplexes with 3'dTdT overhangs, designed to target human γ 1 (5'-GGAAGAGCCUAUUCAGGUA-3'), γ 2 (5'-AAACCCUGCUUUGC-UGUUA-3') (Rost et al., 2006) and μ 1A (5'-GGCAUCAAGUAUCGG-AAGA-3') (Janvier and Bonifacio, 2005). An alternative siRNA targeting γ 2 (γ 2 siRNA#2; 5'-CACAGAACACAGCAUAUCU-3'), with a 3'dTdT overhang, was purchased from Bioneer Inc (Alameda, CA). The MISSION siRNA Universal Negative Control (SIC001, Sigma-Aldrich) was used in control experiments. HeLa cells were subjected to two rounds of siRNA transfection with a 48 h interval, using the Oligofectamine reagent (Thermo Scientific). At 4 days after the first siRNA transfection, cells were transfected with DNA plasmids and analyzed on day 5.

Antibodies

Monoclonal antibodies to human CD4 (S3.5; dilution 1:100), used for immunofluorescence and FACS analysis, were from Thermo Scientific. Monoclonal antibodies to β -actin (C4; sc-47778, Santa Cruz Biotechnology) and γ 1 (610386; clone 88, adaptin- γ ; BD Biosciences, San Jose, CA), at 1:1000 dilution, and rabbit polyclonal antibodies to human CD4 (H370; Santa Cruz Biotechnology, CA), γ 2-adaptin (HPA004106; Sigma-Aldrich), μ 1A-adaptin (AB111135; Abcam, Cambridge, MA), cathepsin D (cat. no. 219361; Calbiochem, San Diego, CA), at 1:1000 dilution, and EGFR (1:5000, AB52894; Abcam), were used for immunoblot experiments. The rabbit antiserum to HIV-1 Nef, used for immunoblot experiments (1:2000 dilution), was obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (Shugars et al., 1993). Mouse monoclonal antibodies to human EEA1 (14/EEA1), CD63 (H5C6), γ 1-adaptin (610386; clone 88, BD Biosciences), transferrin receptor (H68.4, Thermo Scientific) and cytochrome *c* (SC-13560, Santa Cruz Biotechnology); and rabbit polyclonal antibody to γ 2-adaptin, were used for immunofluorescence experiments at 1:100 dilution. Horseradish-peroxidase-conjugated donkey anti-mouse immunoglobulin G (IgG) and donkey anti-rabbit IgG were obtained from GE Healthcare. Secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores were purchased from Thermo Scientific.

FACS analysis

To assay for surface CD4, unfixed cells were incubated at 4°C with APC (allophycocyanin)-conjugated anti-CD4 and prepared for FACS analysis. Corresponding isotype control IgGs, conjugated to APC (Thermo Scientific) were used to control for non-specific antibody labeling. FACS data were acquired using the levels of APC fluorescence in cells expressing GFP from a FACSDiva flow cytometer (BD Biosciences). We used the FloJo software (Tree Star, Ashland, OR) for data analyses.

LysoTracker staining and immunofluorescence microscopy

To label acid vesicles, HeLa cells grown overnight on glass coverslips were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with 75 nM of LysoTracker DND-99 (Life Technologies, Molecular Probes) in Dulbecco's

modified Eagle's medium (DMEM) for 30 min, as previously described (Brito de Souza et al., 2014). For immunofluorescence, cells were then fixed for 15 min at room temperature with 4% (w/v) paraformaldehyde (PFA) in PBS. PFA-fixed cells were permeabilized with 0.01% (w/v) saponin in blocking solution [0.2% (w/v) pork skin gelatin in PBS] for 15 min at 37°C, and labeled as previously described. Cells were imaged on a Zeiss confocal laser-scanning microscope (LSM) 780 (Zeiss, Jena, Germany). Post-acquisition image processing and colocalization analysis were as previously described (Amorim et al., 2014).

SDS-PAGE and immunoblot analysis

Total cell lysates were prepared and equalized for total protein concentration, as previously described (Amorim et al., 2014). Protein homogenates were mixed with sample buffer [SDS 4%, Tris-HCl 160 mM (pH 6.8), glycerol 20%, DTT 100 mM and 0.005% Bromophenol Blue] and boiled. The proteins were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions, and electro-transferred to nitrocellulose membranes (Millipore, Bedford, MA). Blots were probed with primary antibodies and appropriate HRP-conjugated secondary antibodies. Proteins in the blots were visualized by enhanced chemiluminescence using ECL (GE Healthcare).

Metabolic labeling and immunoprecipitation of cathepsin D

Metabolic labeling and immunoprecipitation were performed as previously described (Bonifacio, 2016) with minor changes. In brief, HeLa cells were treated with siRNA as described above. Cells were rinsed with PBS and incubated in pre-label medium [DMEM, –Cys –Met (Sigma-Aldrich)] for 30 min at 37°C. Cells were pulse-labeled for 20 min at 37°C using 0.1 mCi/ml [35 S]methionine-cysteine (Express Protein Label; Perkin Elmer-Cetus, Boston, MA), rinsed and chased for 5 h at 37°C in regular culture medium supplemented with excess methionine (0.06 mg/ml) and cysteine (0.1 mg/ml). After 5 h, the chase medium was collected and cells were rinsed twice with ice-cold PBS and lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Both cell extracts and media were used to immunoprecipitate cathepsin D, which was analyzed by SDS-PAGE and fluorography using a Phosphor FX Plus Molecular Imager (Biorad).

EGF uptake and degradation assay

For immunofluorescence experiments, cells were incubated with Opti-MEM culture medium for 1 h at 37°C. Cells were then stimulated with Alexa-Fluor-488-EGF (Thermo Scientific) (100 ng/ml in Opti-MEM) for 5 min at 37°C, washed with complete DMEM, followed by Alexa-Fluor-488-EGF chasing for 30 or 120 min at 37°C. The cells were fixed after each time point with 4% (w/v) PFA in PBS for 15 min at room temperature. For immunoblot analysis of EGFR degradation, starved cells were pre-incubated for 30 min with 20 μ g/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich) in Opti-MEM. The cells were then incubated with 50 ng/ml of unlabeled EGF (Thermo Scientific) in Opti-MEM, supplemented with cycloheximide, at 4°C for 30 min. Cells were washed twice with ice-cold PBS, and further incubated with 0.2 mg/ml of EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) in ice-cold PBS for 30 min at 4°C, washed and further incubated with 50 mM NH₄Cl for 15 min. Cells were incubated with complete DMEM at 37°C for the times indicated in Fig. 8. Cell lysates were centrifuged at 20,000 *g* for 10 min at 4°C, and equal amounts of total protein in supernatants were incubated with pre-washed 30 μ l of Neutravidin Plus UltraLink Resin (Thermo Scientific) for 3 h on a wheel at 4°C. Following washing with ice-cold lysis buffer, proteins were eluted from the beads with sample buffer and analyzed by immunoblotting.

Statistical analysis

Data were plotted and analyzed using GraphPad Prism 5.0 software. For colocalization analyses, statistical significance was calculated by using a two-tailed paired *t*-test. One-way ANOVA, followed by a post-hoc multiple Bonferroni's test was used for all the other statistical significance calculations. The *P* values are as labeled as follows: **P*<0.05; ***P*<0.005; ****P*<0.0005; ns, not significant. Differences were considered statistically significant at *P*<0.05.

Acknowledgements

We thank J. Bonifacio, K. Strelb, J. Miller and the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program for the kind donation of reagents; A.N. de Carvalho, R.R.C. Rosales, D. Ferraz and M.H.S. Martins for excellent technical assistance. We are grateful to R.O. de Castro for assistance with constructs.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

L.A.T., E.M.L.d.S. and L.L.P.d. designed the research; L.A.T., E.M.L.d.S., M.E.d.S.-J., Y.C.J. and J.V.d.C. performed the experiments; G.A.M. performed tridimensional structure analysis; L.A.T., E.M.L.d.S., M.E.d.S.-J., Y.C.J., G.A.M. and L.L.P.d. analyzed the data; L.A.T., E.M.L.d.S., G.A.M. and L.L.P.d. wrote the paper.

Funding

The present study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo Research Foundation; FAPESP) grants (2014/25812-0 and 2014/02438-6) and Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA) grants to L.L.P.d.; and a Dirección de Investigación, Universidad Austral de Chile (DID-UACH) grant to G.A.M. The study was also supported by FAPESP-EMU 2009/54014-7 for the Multi-user Laboratory of Multi-photon Microscopy. L.A.T. and M.E.d.S.-J. were supported with Masters fellowships; and E.M.L.d.S. and J.V.d.C. with doctoral fellowships by FAPESP. Y.C.J. was supported with a Masters fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Brazilian Ministry of Education).

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jcs.192104.supplemental>

References

- Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. and Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**, 853–864.
- Amorim, N. A., da Silva, E. M. L., de Castro, R. O., da Silva-Januario, M. E., Mendonça, L. M., Bonifacio, J. S., da Costa, L. J. and da Silva, L. L. P. (2014). Interaction of HIV-1 Nef protein with the host protein Alix promotes lysosomal targeting of CD4 receptor. *J. Biol. Chem.* **289**, 27744–27756.
- Austin, C., Boehm, M. and Tooze, S. A. (2002). Site-specific cross-linking reveals a differential direct interaction of class 1, 2, and 3 ADP-ribosylation factors with adaptor protein complexes 1 and 3. *Biochemistry* **41**, 4669–4677.
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A. and Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* **162**, 435–442.
- Benson, R. E., Sanfridson, A., Ottinger, J. S., Doyle, C. and Cullen, B. R. (1993). Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J. Exp. Med.* **177**, 1561–1566.
- Bishop, N., Horman, A. and Woodman, P. (2002). Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein–ubiquitin conjugates. *J. Cell Biol.* **157**, 91–102.
- Boehm, M. and Bonifacio, J. S. (2001). Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2907–2920.
- Boehm, M. and Bonifacio, J. S. (2002). Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene* **286**, 175–186.
- Bonifacio, J. S. (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J. Cell Biol.* **204**, 7–17.
- Bonifacio, J. S., Gershlick, D. C. and Dell'Angelica, E. C. (2016). Immunoprecipitation. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **71**, 7.2.1–7.2.24.
- Bresnahan, P. A., Yonemoto, W., Ferrell, S., Williams-Herman, D., Gelezianus, R. and Greene, W. C. (1998). A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr. Biol.* **8**, 1235–1238.
- Brito de Souza, L., Pinto da Silva, L. L., Jamur, M. C. and Oliver, C. (2014). Phospholipase D is involved in the formation of Golgi associated clathrin coated vesicles in human parotid duct cells. *PLoS ONE* **9**, e91868.
- Burtey, A., Rappoport, J. Z., Bouchet, J., Basmaciogullari, S., Guatelli, J., Simon, S. M., Benichou, S. and Benmerah, A. (2007). Dynamic interaction of HIV-1 Nef with the clathrin-mediated endocytic pathway at the plasma membrane. *Traffic* **8**, 61–76.
- Chaudhuri, R., Lindwasser, O. W., Smith, W. J., Hurley, J. H. and Bonifacio, J. S. (2007). Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J. Virol.* **81**, 3877–3890.
- Chaudhuri, R., Mattera, R., Lindwasser, O. W., Robinson, M. S. and Bonifacio, J. S. (2009). A basic patch on alpha-adaptin is required for binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef and cooperative assembly of a CD4-Nef-AP-2 complex. *J. Virol.* **83**, 2518–2530.
- Coleman, S. H., Van Damme, N., Day, J. R., Noviello, C. M., Hitchin, D., Madrid, R., Benichou, S. and Guatelli, J. C. (2005). Leucine-specific, functional interactions between human immunodeficiency virus type 1 Nef and adaptor protein complexes. *J. Virol.* **79**, 2066–2078.
- Cortés, M. J., Wong-Staal, F. and Lama, J. (2002). Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 1770–1779.
- Costa, L. J., Chen, N., Lopes, A., Aguiar, R. S., Tanuri, A., Plemenitas, A. and Peterlin, B. M. (2006). Interactions between Nef and AP1 proliferate multivesicular bodies and facilitate egress of HIV-1. *Retrovirology* **3**, 33.
- Craig, H. M., Pandori, M. W. and Guatelli, J. C. (1998). Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11229–11234.
- daSilva, L. L. P., Sougrat, R., Burgos, P. V., Janvier, K., Mattera, R. and Bonifacio, J. S. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein targets CD4 to the multivesicular body pathway. *J. Virol.* **83**, 6578–6590.
- DaSilva, L. L. P., Wall, M. J., de Almeida, S. C., Wauters, S. C., Januário, Y. C., Müller, J. Corrêa, S. A. (2016). Activity-regulated cytoskeleton-associated protein controls AMPAR endocytosis through a direct interaction with clathrin-adaptor protein 2. *eNeuro* **3.3**
- Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Ellett, A., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Chatfield, C. et al. (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988–991.
- Dikeakos, J. D., Thomas, L., Kwon, G., Eiferich, J., Shinde, U. and Thomas, G. (2012). An interdomain binding site on HIV-1 Nef interacts with PACS-1 and PACS-2 on endosomes to down-regulate MHC-I. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2184–2197.
- Dirk, B. S., Jacob, R. A., Johnson, A. L., Pawlak, E. N., Cavanagh, P. C., Van Nynatten, L., Haeryfar, S. M. and Dikeakos, J. D. (2015). Viral bimolecular fluorescence complementation: a novel tool to study intracellular vesicular trafficking pathways. *PLoS ONE* **10**, e0125619.
- Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G. and Kornfeld, S. (2007). The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1887–1896.
- Döring, T., Gotthardt, K., Stieler, J. and Prange, R. (2010). γ 2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 1252–1264.
- Farias, G. G., Cuitino, L., Guo, X., Ren, X., Jarnik, M., Mattera, R. and Bonifacio, J. S. (2012). Signal-mediated, AP-1/clathrin-dependent sorting of transmembrane receptors to the somatodendritic domain of hippocampal neurons. *Neuron* **75**, 810–823.
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J. and Hopkins, C. R. (1990). Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* **61**, 623–634.
- Fölsch, H., Pypaert, M., Schu, P. and Mellman, I. (2001). Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **152**, 595–606.
- Garcia, J. V. and Miller, A. D. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**, 508–511.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202–213.
- Gorry, P. R., McPhee, D. A., Verity, E., Dyer, W. B., Wesselingh, S. L., Learmont, J., Sullivan, J. S., Roche, M., Zaunders, J. J., Gabuzda, D. et al. (2007). Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* **4**, 66.
- Grant, B. D. and Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 597–608.
- Greenberg, M. E., Bronson, S., Lock, M., Neumann, M., Pavlakis, G. N. and Skowronski, J. (1997). Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.* **16**, 6964–6976.
- Greenberg, M., DeTulleo, L., Rapoport, I., Skowronski, J. and Kirchhausen, T. (1998). A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr. Biol.* **8**, 1239–1242.
- Grzesiek, S., Stahl, S. J., Wingfield, P. T. and Bax, A. (1996). The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**, 10256–10261.
- Gulizia, R. J., Collman, R. G., Levy, J. A., Trono, D. and Mosier, D. E. (1997). Deletion of nef slows but does not prevent CD4-positive T-cell depletion in human immunodeficiency virus type 1-infected human-PBL-SCID mice. *J. Virol.* **71**, 4161–4164.
- Guo, X., Mattera, R., Ren, X., Chen, Y., Retamal, C., González, A. and Bonifacio, J. S. (2013). The adaptor protein-1 mu1B subunit expands the repertoire of basolateral sorting signal recognition in epithelial cells. *Dev. Cell* **27**, 353–366.

- Guy, B., Kieny, M. P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L. and Lecocq, J.-P. (1987). HIV F3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**, 266–269.
- Heldwein, E. E., Macia, E., Wang, J., Yin, H. L., Kirchhausen, T. and Harrison, S. C. (2004). Crystal structure of the clathrin adaptor protein 1 core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 14108–14113.
- Hirst, J., Sahlender, D. A., Choma, M., Sinka, R., Harbour, M. E., Parkinson, M. and Robinson, M. S. (2009). Spatial and functional relationship of GGAs and AP-1 in *Drosophila* and HeLa cells. *Traffic* **10**, 1696–1710.
- Hirst, J., Borner, G. H. H., Antrobus, R., Peden, A. A., Hodson, N. A., Sahlender, D. A. and Robinson, M. S. (2012). Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the “knocksideways” system. *Curr. Biol.* **22**, 1711–1716.
- Janvier, K. and Bonifacino, J. S. (2005). Role of the Endocytic Machinery in the Sorting of Lysosome-associated Membrane Proteins. *Mol. Biol. Cell.* **16**, 4231–4242.
- Janvier, K., Craig, H., Hitchin, D., Madrid, R., Sol-Foulon, N., Renault, L., Cherfils, J., Cassel, D., Benichou, S. and Guatelli, J. (2003a). HIV-1 Nef stabilizes the association of adaptor protein complexes with membranes. *J. Biol. Chem.* **278**, 8725–8732.
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J. R., Martina, J. A., Kim, B.-Y., Venkatesan, S. and Bonifacino, J. S. (2003b). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 γ - σ 1 and AP-3 δ - σ 3 hemicomplexes. *J. Cell Biol.* **163**, 1281–1290.
- Jesus da Costa, L., Lopes dos Santos, A., Mandic, R., Shaw, K., Santana de Aguiar, R., Tanuri, A., Luciw, P. A. and Peterlin, B. M. (2009). Interactions between SIVNef, SIVGagPol and Alix correlate with viral replication and progression to AIDS in rhesus macaques. *Virology* **394**, 47–56.
- Kestier, H. W., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D. and Desrosiers, R. C. (1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651–662.
- Krieger, E., Joo, K., Lee, J., Lee, J., Raman, S., Thompson, J., Tyka, M., Baker, D. and Karplus, K. (2009). Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins* **77** Suppl. 9, 114–122.
- Krissinel, E. (2010). Crystal contacts as nature's docking solutions. *J. Comput. Chem.* **31**, 133–143.
- Lama, J., Mangasarian, A. and Trono, D. (1999). Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.* **9**, 622–631.
- Learmont, J. C., Geczy, A. F., Mills, J., Ashton, L. J., Raynes-Greenow, C. H., Garsia, R. J., Dyer, W. B., McIntyre, L., Oelrichs, R. B., Rhodes, D. I. et al. (1999). Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1—A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1715–1722.
- Lemieux, B., Percival, M. D. and Falgout, J.-P. (2004). Quantitation of the lysosomotropic character of cationic amphiphilic drugs using the fluorescent basic amine Red DND-99. *Anal. Biochem.* **327**, 247–251.
- Leonard, J. A., Filzen, T., Carter, C. C., Schaefer, M. and Collins, K. L. (2011). HIV-1 Nef disrupts intracellular trafficking of major histocompatibility complex class I, CD4, CD8, and CD28 by distinct pathways that share common elements. *J. Virol.* **85**, 6867–6881.
- Lindwasser, O. W., Smith, W. J., Chaudhuri, R., Yang, P., Hurley, J. H. and Bonifacino, J. S. (2008). A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *J. Virol.* **82**, 1166–1174.
- Lubben, N. B., Sahlender, D. A., Motley, A. M., Lehner, P. J., Benaroch, P. and Robinson, M. S. (2007). HIV-1 Nef-induced down-regulation of MHC class I requires AP-1 and clathrin but not PACS-1 and is impeded by AP-2. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3351–3365.
- MacDonald, M. L., Lamerdin, J., Owens, S., Keon, B. H., Bilter, G. K., Shang, Z., Huang, Z., Yu, H., Dias, J., Minami, T. et al. (2006). Identifying off-target effects and hidden phenotypes of drugs in human cells. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 329–337.
- Mariani, R. and Skowronski, J. (1993). CD4 down-regulation by nef alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5549–5553.
- Mattera, R., Boehm, M., Chaudhuri, R., Prabhu, Y. and Bonifacino, J. S. (2011). Conservation and diversification of dileucine signal recognition by adaptor protein (AP) complex variants. *J. Biol. Chem.* **286**, 2022–2030.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.-L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P. (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J.* **19**, 2193–2203.
- Motley, A., Bright, N. A., Seaman, M. N. J. and Robinson, M. S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J. Cell Biol.* **162**, 909–918.
- Oelrichs, R., Tsykin, A., Rhodes, D., Solomon, A., Ellett, A., McPhee, D. and Deacon, N. (1998). Sequence Note: Genomic sequence of HIV type 1 from four members of the Sydney Blood Bank Cohort of long-term nonprogressors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 811–814.
- Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, R. C., Foelsch, H., Mellman, I., Saito, T., Shirasawa, T. and Bonifacino, J. S. (1999). Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* **449**, 215–220.
- Peden, A. A., Rudge, R. E., Lui, W. W. Y. and Robinson, M. S. (2002). Assembly and function of AP-3 complexes in cells expressing mutant subunits. *J. Cell Biol.* **156**, 327–336.
- Pereira, E. A. and daSilva, L. L. P. (2016). HIV-1 Nef: taking control of protein trafficking. *Traffic* **17**, 976–996.
- Poe, J. A. and Smithgall, T. E. (2009). HIV-1 Nef dimerization is required for Nef-mediated receptor downregulation and viral replication. *J. Mol. Biol.* **394**, 329–342.
- Poe, J. A., Vollmer, L., Vogt, A. and Smithgall, T. E. (2014). Development and validation of a high-content bimolecular fluorescence complementation assay for small-molecule inhibitors of HIV-1 Nef dimerization. *J. Biomol. Screen.* **19**, 556–565.
- Preusser, A., Briesse, L., Baur, A. S. and Willbold, D. (2001). Direct in vitro binding of full-length human immunodeficiency virus type 1 Nef protein to CD4 cytoplasmic domain. *J. Virol.* **75**, 3960–3964.
- Ren, X., Farias, G. G., Canagarajah, B. J., Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H. (2013). Structural basis for recruitment and activation of the AP-1 clathrin adaptor complex by Arf1. *Cell* **152**, 755–767.
- Ren, X., Park, S. Y., Bonifacino, J. S. and Hurley, J. H. (2014). How HIV-1 Nef hijacks the AP-2 clathrin adaptor to downregulate CD4. *eLife* **3**, e01754.
- Rhee, S. S. and Marsh, J. W. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J. Virol.* **68**, 5156–5163.
- Robinson, M. S. (2015). Forty years of clathrin-coated vesicles. *Traffic* **16**, 1210–1238.
- Rossi, F., Gallina, A. and Milanesi, G. (1996). Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology* **217**, 397–403.
- Rost, M., Mann, S., Lambert, C., Döring, T., Thome, N. and Prange, R. (2006). Gamma-adaptin, a novel ubiquitin-interacting adaptor, and Nedd4 ubiquitin ligase control hepatitis B virus maturation. *J. Biol. Chem.* **281**, 29297–29308.
- Rost, M., Döring, T. and Prange, R. (2008). gamma2-Adaptin, a ubiquitin-interacting adaptor, is a substrate to coupled ubiquitination by the ubiquitin ligase Nedd4 and functions in the endosomal pathway. *J. Biol. Chem.* **283**, 32119–32130.
- Schaefer, M. R., Wonderlich, E. R., Roeth, J. F., Leonard, J. A. and Collins, K. L. (2008). HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog.* **4**, e1000131.
- Shields, S. B. and Piper, R. C. (2011). How ubiquitin functions with ESCRTs. *Traffic* **12**, 1306–1317.
- Shugars, D. C., Smith, M. S., Glueck, D. H., Nantermet, P. V., Seillier-Moiseiwitsch, F. and Swanstrom, R. (1993). Analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef gene sequences present in vivo. *J. Virol.* **67**, 4639–4650.
- Sugden, S. M., Bego, M. G., Pham, T. N. Q. and Cohen, E. A. (2016). Remodeling of the host cell plasma membrane by HIV-1 Nef and Vpu: a strategy to ensure viral fitness and persistence. *Viruses* **8**, 67.
- Takatsu, H., Sakurai, M., Shin, H.-W., Murakami, K. and Nakayama, K. (1998). Identification and characterization of novel clathrin adaptor-related proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 24693–24700.
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. and Yin, H. L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi. *Cell* **114**, 299–310.
- Williams, R. L. and Urbé, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 355–368.
- Zizioli, D., Meyer, C., Guhde, G., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P. (1999). Early embryonic death of mice deficient in gamma-adaptin. *J. Biol. Chem.* **274**, 5385–5390.

Supplemental Figures

Figure S1. Amino acid residues predicted by homology modeling involved in the interaction of Nef with $\gamma 1$ - $\sigma 1A$ or $\gamma 2$ - $\sigma 1A$. (A-B) Surface representation of the predicted contacts between Nef and $\gamma 1$ - $\sigma 1A$ (A), and between Nef and $\gamma 2$ - $\sigma 1A$ (B). The corresponding interfaces of Nef (Ai, Bi), or of $\gamma 1$ - $\sigma 1A$ and $\gamma 2$ - $\sigma 1A$ (Aii, Bii), were rotated by 90° to expose the interaction surfaces. The surface of Nef interacting residues are colored as follows: grey, residues interacting with $\sigma 1A$ (Ai-Bi); pink, residues interacting with $\gamma 1$ (Ai); orange, residues interacting with $\gamma 2$ (Bi); and green, residues interacting with the corresponding both subunits (Ai, Bi). The surface of the interacting residues of the $\gamma 1$ - or $\gamma 2$ - $\sigma 1A$ hemi-complexes are colored as follows: grey, residues of $\sigma 1A$ interacting with Nef (Aii, Bii); pink, residues of $\gamma 1$ interacting with Nef (Aii); orange, residues of $\gamma 2$ interacting with Nef (Bii). Interacting residues are labeled using the one-letter code, and are colored as in the surface representation, with the exception of residues predicted to interact by both hydrogen bonds and salt bridges that are colored in red and highlighted by a red ellipse, or by hydrogen bonds only that are colored in blue and highlighted by a blue ellipse. The basic residues $\gamma 1$ Arg¹⁵ and $\gamma 2$ Arg¹⁶, tested by Y3H analysis, are highlighted by a green ellipse. Note that the number of residues predicted to participate in hydrogen bonds and/or salt bridges interactions of Nef with $\gamma 1$ - $\sigma 1A$ (10 residues in Nef and 12 in $\gamma 1$ - $\sigma 1A$) is higher than in Nef with $\gamma 2$ - $\sigma 1A$ (7 residues in Nef and 10 in $\gamma 1$ - $\sigma 1A$). Red asterisks indicate residues of the Nef dileucine motif, and blue asterisks indicate Nef Arg¹⁷⁸ predicted to be accommodated in a concave pocket of each hemi-complex (blue-dotted circles in the corresponding hemi-complex structures, Aii and Bii). (C-D) Zoom of the predicted concave pockets at the surface of $\gamma 1$ - $\sigma 1A$ (C) and of $\gamma 2$ - $\sigma 1A$ (D) that accommodate Nef Arg¹⁷⁸ (shown in stick model).

Figure S2. Depletion of $\gamma 2$ by siRNA #2 leads to the impairment of CD4 degradation by Nef, and depletion of $\gamma 2$ inhibits CD4 degradation induced by Nef from different HIV-1 and SIV strains. (A) HeLa cells were transfected with control siRNA, $\gamma 2$ siRNA #1 or $\gamma 2$ siRNA #2, twice with a 48 h interval and then equivalent amounts of cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies to $\gamma 2$, $\gamma 1$ and β -actin. (B) The $\gamma 2$ signal intensity for each condition shown in panel A was determined using the Image Lab Software and is expressed as percentage of the $\gamma 2$ signal in cells transfected with control siRNA. Note that $\gamma 2$ siRNA #1 and #2 does not affect the levels of $\gamma 1$. Bars represent the means $\pm$ S.E.M., (n=3). (C) HeLa cells were treated with control siRNA and $\gamma 2$ siRNA #2, as in (A), and then transfected with pCMV-CD4 together with pCIneo-Nef L/A or pCIneo-Nef WT, and after 20 h equivalent amounts of cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies to CD4, Nef, $\gamma 2$ and β -Actin (loading control). *, Nonspecific protein bands. (D) The CD4 signal intensity for each condition shown in panel (C) was determined using the Image Lab Software (Biorad), and is expressed as percentage of the CD4 signal from cells transfected with empty vector. Bars represent the mean values $\pm$ S.E.M. (n=4). The percentage reduction between Nef L/A and Nef WT for each condition is shown. (E) After the second round of siRNA transfection, cells were transfected with the same amount of pCMV-CD4 together with either pIRES.GFP, pHIV-1NefNA7.IRES.GFP, pHIV-1Nef248.IRES.GFP or pSIVmac293Nef.IRES.GFP, and after 20h equivalent amounts of cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with antibodies to CD4, HIV-1 Nef, $\gamma 2$ and GFP. *, Nonspecific protein bands. Note that the anti-HIV-1 Nef antibody does not cross-react with the SIVmac293 variant and transfection with pSIVmac293Nef.IRES.GFP is monitored by GFP expression. The immunoblots shown are preventative of three independent experiments.

Figure S3: The relative importance of $\gamma 1$ and $\gamma 2$ -adaptin for delivery of acid hydrolases to lysosomes. (A-C) HeLa cells were transfected with control siRNA or siRNA for $\gamma 1$ or $\gamma 2$ twice at 48 h intervals. **(A)** After 24 h cells were pulse-labeled with [^{35}S] methionine-cysteine for 20 min, followed by incubation in chase buffer for 5 h at 37°C. Cell extracts and culture media (supernatants) were used for immunoprecipitation with antibody to cathepsin D, and the resulting immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and fluorography. The positions of pro-(pro-catD), intermediate (int-catD), and mature cathepsin D (m-catD) forms are indicated. The results are representative of three independent experiments. **(B)** After 16 h, cells were fixed, permeabilized, and stained with rabbit polyclonal antibody to cathepsin D, followed by incubation with Alexa 488-conjugated donkey antibody to rabbit IgG. Cells were imaged by confocal laser scanning microscopy using the same settings. Bars, 20 μm . **(C)** The MFI of Alexa 488 puncta for each condition shown in panel (B) was determined using the Image J Software and is expressed as percentage of the Alexa 488 signal in siRNA control conditions. Values are the averaged mean relative $\pm$ S.E.M (n=10 cells of 3 independent experiments). ***; $p < 0.0005$. ns, not significant.

Figure S4: Depletion of $\gamma 2$ by siRNA #2 impairs the redistribution of CD4 to the juxtanuclear region by HIV Nef. HeLa cells were grown in coverslip and treated twice with control siRNA (A-H), $\gamma 2$ siRNA #1 (I-L) or $\gamma 2$ siRNA #2 (M-P). 24 hours after siRNA treatment, cells were transfected with pCMV.CD4 together with empty pNefLL/AA:ires::GFP (A-D) or pNefWT:ires::GFP (E-P). After 16h, cells were fixed, permeabilized, and stained with mouse monoclonal antibody to CD4 and rabbit polyclonal antibody to $\gamma 2$, followed by Alexa 594-conjugated donkey antibody to mouse IgG (red channel) and Alexa 647-conjugated donkey antibody to rabbit IgG (green channel). Cells were imaged by confocal laser scanning microscopy. The color yellow in the merged images indicates colocalization. Bars, 10 μ m.

Supplemental Table 1:

Official gene/protein symbol of adaptor protein (AP) complex subunits isoforms found in human cells and respective synonyms used in the text.

AP complex	Official Symbol in HGNC (HUGO gene nomenclature committee)	Synonym	GeneID Uniprot	GeneID NCBI database
AP-1	AP1G1	$\gamma 1$	O43747	164
	AP1G2	$\gamma 2$	O75843	8906
	AP1M1	$\mu 1A$	Q9BXS5	8907
	AP1M2	$\mu 1B$	Q9Y6Q5	10053
	AP1S1	$\sigma 1A$	P61966	1174
	AP1S2	$\sigma 1B$	P56377	8905
	AP1S3	$\sigma 3C$	Q96PC3	130340
AP-2	AP2A1	αA	O95782	160
	AP2A2	αC	O94973	161
	AP2B1	$\beta 2$	P63010	163
	AP2M1	$\mu 2$	Q96CW1	1173
	AP2S1	$\sigma 2$	P53680	1175
AP-3	AP3D1	δ	O14617	8943
	AP3B1	$\beta 3A$	O00203	8546
	AP3B2	$\beta 3B$	Q13367	8120
	AP3M1	$\mu 3A$	Q9Y2T2	26985
	AP3M2	$\mu 3B$	P53677	10947
	AP3S1	$\sigma 3A$	Q13367	1176
	AP3S2	$\sigma 3B$	P59780	10239

Supplemental Table 2:**Quantitative analysis of protein colocalization.**

Proteins	Mander's coefficient	
	tM1	tM2
$\gamma 2$ -adaptin and $\gamma 1$ -adaptin	0.34 ± 0.01 ; N=7	0.36 ± 0.01 ; N=7
$\gamma 2$ -adaptin and EEA1	0.26 ± 0.02 ; N=7	0.18 ± 0.03 ; N=7
$\gamma 2$ -adaptin and TfR	0.42 ± 0.04 ; N=5	0.51 ± 0.03 ; N=5
$\gamma 2$ -adaptin and CD63	0.17 ± 0.02 ; N=7	0.34 ± 0.02 ; N=7
$\gamma 2$ -adaptin and cytochrome C	0.05 ± 0.01 ; N=9	0.06 ± 0.02 ; N=9
CD4 and $\gamma 2$ -adaptin	0.11 ± 0.02 ; N=6	0.09 ± 0.01 ; N=6
CD4 and $\gamma 2$ -adaptin in Nef cells	0.64 ± 0.03 ; N=6	0.34 ± 0.02 ; N=6
CD4 and EEA1 in Nef cells (Control)	0.27 ± 0.02 ; N=5	0.27 ± 0.04 ; N=5
CD4 and EEA1 in Nef cells (siRNA $\gamma 2$ -adaptin)	0.70 ± 0.02 ; N=5	0.64 ± 0.03 ; N=5
CD4 and Lysotracker in Nef cells (Control)	0.42 ± 0.03 ; N=5	0.43 ± 0.05 ; N=5
CD4 and Lysotracker in Nef cells (siRNA $\gamma 2$ -adaptin)	0.41 ± 0.03 ; N=5	0.26 ± 0.02 ; N=5
CD4 and BiFC	0.56 ± 0.02 ; N=5	0.60 ± 0.04 ; N=5
$\gamma 2$ -adaptin and BiFC	0.57 ± 0.02 ; N=5	0.56 ± 0.03 ; N=5
$\gamma 2$ -adaptin and CD4:BiFC	0.79 ± 0.02 ; N=5	0.73 ± 0.02 ; N=5
$\gamma 2$ -adaptin and 90° rotated CD4:BiFC	0.11 ± 0.01 ; N=5	0.09 ± 0.008 ; N=5
CD4 and $\gamma 2$ -adaptin in Nef + GFP cells	0.51 ± 0.02 ; N=5	0.37 ± 0.04 ; N=5
CD4 and $\gamma 2$ -adaptin in Nef + HRS-GFP cells	0.59 ± 0.01 ; N=5	0.36 ± 0.04 ; N=5
CD4 and HRS-GFP in Nef cells	0.62 ± 0.01 ; N=6	0.86 ± 0.05 ; N=6
$\gamma 2$ -adaptin and CD4:HRS-GFP in Nef cells	0.75 ± 0.09 ; N=6	0.89 ± 0.06 ; N=6
$\gamma 2$ -adaptin and 90° rotated CD4:HRS-GFP in Nef cells	0.09 ± 0.009 ; N=6	0.07 ± 0.01 ; N=6

Footnote: Quantification of colocalization was performed using the colocalization threshold plug-in in the ImageJ software (Abramoff et al., 2004). This allowed the determination of single-channel specific Mander's overlap coefficients: tM1, defined as the total intensity of pixels from channel 1 (green), for which the intensity in the channel 2 (red) is above zero, relative to total intensity in channel 1; and tM2, defined as the total intensity of pixels from channel 2, for which the intensity in channel 1 is above zero, relative to total intensity in channel 2. The coefficients were calculated using an automatically determined threshold value, for both channels, according to the algorithm of Costes et al. (2004), where a value of 1 represents total colocalization. The table shows the means $\pm$ S.E.M. of tM1 and tM2, indicating the extent of overlap between the signals of the indicated proteins. Data for each pairwise comparison were obtained from a series of Z slices (with 0.3 μ m intervals) of at least five cells, from a total of three independent experiments. For triple colocalization analysis the colocalization pixel map from two channels was obtained as described above and used as one of the channels in a second round of colocalization analysis with the third channel.

Apêndice

Armando Meyer
Editor

Exosomes

Biogenesis,
Therapeutic Applications
and Emerging Research

CELL BIOLOGY
RESEARCH PROGRESS

NOVA

Nova
Biomedical

Chapter

MOLECULAR MECHANISMS OF EXOSOME BIOGENESIS

***Mara E. da Silva-Januário, Yunan C. Januário,
Julianne V. de Carvalho and Luis L. P. daSilva****

Department of Cell and Molecular Biology,
Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo,
Ribeirão Preto, Brazil

ABSTRACT

Exosomes are small (30-100 nm diameter) membrane enclosed vesicles of endosomal origin, released by a variety of cell types, which are capable of transferring biologically active macromolecules, such as proteins, lipids and RNA to other cells. Therefore, exosomes are important mediators of intercellular communication influencing physiological or pathological processes at recipient cells. In fact, there is a growing body of evidence indicating that exosomes may contribute to functions as broad as tissue repair, neural communication, transfer of pathogens virulence factors and cancer metastasis. Despite the impressive advance in the field of exosome research, the difficulty in separating exosomes from other extracellular vesicles with different origins represents a major challenge to attribute specific functions to exosomes. Therefore, overcoming these limitations is crucial to achieving a clear understanding of the unique features controlling exosomes biogenesis. In

* Corresponding Author address: Email: lldasilva@fmrp.usp.br.

this chapter, we briefly review the knowledge gained on the molecular mechanisms underlying exosome formation and release.

Keywords: extracellular vesicles, exosome, multivesicular body (MVB), ESCRT

INTRODUCTION

The ability to release membrane-enclosed vesicles to the extracellular milieu is a feature of cells that spans kingdoms of life. These extracellular vesicles (EVs) may function as mediators of intercellular communication allowing the transfer of biologically active material between cells within an organism and between different organisms. The molecules exchanged via EVs range from nucleic acids, proteins, and lipids. EVs differ significantly in size and constitution and may originate from distinct subcellular sites. Exosomes are currently the most studied type of EV, being defined as membranous nanovesicles ranging from 30 to 100 nm in diameter, derived from invaginations of endosomal limiting membranes that bud inwardly as intraluminal vesicles (ILVs), during endosome maturation. Endosomes containing multiple ILVs are generally termed multivesicular endosomes, or multivesicular bodies (MVBs), with a distinctive morphological appearance under the electron microscope. MVBs may mature to fuse with lysosomes, following a degradative pathway that is used by cells to down-regulate cell surface signaling receptors. In fact, MVBs are mostly studied in this context. MVBs may also fuse with the plasma membrane thereby releasing their ILVs to the extracellular milieu, as exosomes (Figure 1).

A current major challenge in exosome research is the development of methods that would allow discriminating with precision exosomes from other EVs, with similar constitution and size (Colombo et al., 2014). Important aims on the field are to achieve a clear understanding on how MVBs originate in cells, and how MVBs that deliver material to lysosomes differ from MVBs that are involved in the release of exosomes. In this chapter, we briefly review and discuss the most recent findings regarding the biogenesis of exosomes.

Figure 1. The secretory and endocytic pathways and the biogenesis of exosomes. The endocytic pathway transports transmembrane protein cargoes from the plasma membrane (PM) to early endosomes. Although, there are several different mechanisms of endocytosis, all of them are thought to deliver cargo to Rab5-positive early endosomes. Members of the Rab GTPase family are specifically recruited to membranes of different cell compartments and regulate vesicular trafficking. In early endosomes, cargo proteins are selected to at least three different routes, a recycling pathway, a lysosomal pathway or a secretory pathway. In the recycling pathway, Rab5 membrane enrichment is switched to Rab11, and the cargo proteins are transported back to the plasma membrane. Between the secretory and the lysosomal routes, the early endosomes start a process of maturation switching Rab5 for Rab7 (late endosome), which also initiates the formation of intraluminal vesicles (ILVs). The crescent number of ILVs leads to the formation of multivesicular endosomes, or bodies (MVBs) that can fuse to lysosomes, to degrade ILVs and cargoes. Alternatively, MVBs associated with Rab27, Rab35 or Rab11, fuse with the PM and release their ILVs as exosomes. It is unclear if the MVBs destined to fuse with the PM or lysosomes are formed in distinct manners, or if the differences are restricted to targeting steps after MVBs are already formed. The exosomes originated from ILVs of MVBs are nanovesicles ranging from 30-100 nm in diameter. Cells also produce microvesicles sized 100-1000 nm that bud directly from the plasma membrane and may have different contents compared to exosomes.

1. ORIGIN OF EXOSOMES

EVs are categorized based on their cellular origin, biogenesis and biological functions (Raposo and Stoorvogel, 2013). Exosomes are a population of membranous vesicles derived from the endolysosomal pathway. Membrane proteins, including surface receptors destined for degradation in lysosomes, should be first incorporated into nascent vesicles of MVBs (Raiborg and Stenmark, 2009). These vesicles bud to the interior of early endosomes and are released into the lumen of these organelles, resulting in the progressive accumulation of ILVs in MVBs, giving their characteristic appearance (van Deurs et al., 1993). The delivery of ILVs and their contents for degradation in the lumen of lysosomes is achieved by the fusion of the MVBs and lysosomes limiting membranes.

Alternatively, MVBs can fuse with the plasma membrane and thus release their ILVs and other luminal contents to the cell exterior. These secreted vesicles are named exosomes (Johnstone et al., 1991) (see Figure 1). Once released, exosomes can exert important effects in other cells. These vesicles can dock and fuse with the plasma membrane of target cells or be endocytosed by them, delivering lipids, membrane proteins, and soluble macromolecules into the recipient cells. Also, they can directly activate cell surface receptors via interaction with molecules on the surface of exosomes (Théry et al., 2009).

Exosomes have a typical composition and size that reflect their origin as ILVs of MVBs. These nanovesicles are enclosed by a lipid bilayer and are enriched with molecules that are part of the machinery that mediates the biogenesis of ILVs of MVBs (Théry et al., 2001). These include the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) proteins, tetraspanins and specific lipid species (Table 1). In contrast, resident proteins of the nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum (ER) and Golgi complex are normally absent in exosomes (Théry et al., 2001).

The exosomes limiting membrane are organized as lipid bilayers that contain typical lipid composition (Carayon et al., 2011; Llorente et al., 2013). These vesicles are enriched in sphingomyelin, ceramide, and cholesterol (Möbius et al., 2002; Trajkovic et al., 2008); and also in proteins that associate with lipid rafts, as glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and flotillin (Lachenal et al., 2011; Théry et al., 1999; Wubbolts et al., 2003) (Table 1). It has been proposed that some of these lipids may play active roles in the process of ILV formation and exosome biogenesis (Babst, 2011; Stuffers et al., 2009; Trajkovic et al., 2008), as discussed below.

Table1. Molecules identified in exosomes released from different cell types

Composition	Cell Type	References
Proteins		
Tetraspanins		
CD9	Dendritic cells	(Mittelbrunn et al., 2011)
	Endothelial cells	(van Balkom et al., 2015)
CD37, CD53, CD81, CD82	B cells	(Escola et al., 1998)
CD63	B cells	(Escola et al., 1998)
	Dendritic cells	(Admyre et al., 2003)
	Mastocytes	(Caby et al., 2005)
	Platelets	(Heijnen et al., 1999)
	T cells	(Blanchard et al., 2002)
ESCRT components		
ALIX	Breast cancer cell	(Baietti et al., 2012)
	Dendritic cells	(Théry et al., 2001)
	Hepatocytes	(He et al., 2015)
	Neuronal cells	(Fauré et al., 2006)
TSG101	Dendritic cells	(Mittelbrunn et al., 2011)
	Glioblastoma cells	(Toda et al., 2015)
	Hepatocytes	(He et al., 2015)
	T cells	(Mittelbrunn et al., 2011)
Integrins		
α L β 2	Mastocytes	(Skokos et al., 2001)
α 4 β 1	Reticulocytes	(Rieu et al., 2000)
β 2	T cells	(Blanchard et al., 2002)
α M β 2	Dendritic cells	(Théry et al., 1999)
Antigen presentation		
CD86	B cells	(Escola et al., 1998)
	Dendritic cells	(Admyre et al., 2003)
MHC-I	B cells	(Lynch et al., 2009)
	T cells	(de Carvalho et al., 2014)
	Colon carcinoma cell	(Dai et al., 2005)
	Dendritic cells	(Admyre et al., 2003)
	Mastocytes	(Caby et al., 2005)
	Mesothelioma cells	(Hegmans et al., 2004)
	Intestinal epithelial cells	(Van Niel et al., 2003)
	Platelets	(Pienimaeki-Roemer et al., 2015)
MHC-II	B cells	(Raposo et al., 1996)
	Dendritic cells	(Admyre et al., 2003)
	Intestinal epithelial cells	(Van Niel et al., 2003)
	Melanoma cells	(Lazar et al., 2015)
	Thymus cells	(Skogberg et al., 2013)
Cytoskeletal proteins		
Actin	Dendritic cells	(Théry et al., 1999)
	Enterocytes	(van Niel et al., 2001)
	Mastocytes	(Skokos et al., 2001)

Table 1. (Continued)

Composition	Cell Type	References
Cofilin	Dendritic cells	(Théry et al., 2001)
Tubulin	Dendritic cells	(Théry et al., 2001)
	Enterocytes	(van Niel et al., 2001)
Moesin	B cells	(Wubbolts et al., 2003)
	Endothelial cells	(van Balkom et al., 2015)
Membrane transport and fusion proteins		
Annexins I, II, IV,V, VI	Dendritic cells	(Théry et al., 2001)
Annexin VI	Mastocytes	(Skokos et al., 2001)
Dynamin 1	Platelets	(Pienimaeki-Roemer et al., 2015)
Rab5	B cells	(Buschow et al., 2010)
	Hepatocytes	(He et al., 2015)
Rab7A	B cells	(Buschow et al., 2010)
	Hepatocytes	(He et al., 2015)
Syntaxin 8	Hepatocytes	(He et al., 2015)
	Ovarian cancer cells	(Liang et al., 2013)
Heat-shock proteins		
HSC70	B cells	(Wubbolts et al., 2003)
	Hepatocytes	(He et al., 2015)
	Keratinocytes	(Chavez-Muñoz et al., 2008)
HSP90	B cells	(Wubbolts et al., 2003)
	Intestinal epithelial cells	(van Niel et al., 2001)
Immunoglobulin-family members		
A33 antigen	Enterocytes	(van Niel et al., 2001)
CD4	T cells	(de Carvalho et al., 2014)
ICAM-1/CD54	B cells	(Escola et al., 1998)
	Dendritic cells	(Segura et al., 2005)
	Trophoblast cells	(Atay et al., 2011)
P-selectin	Platelets	(Heijnen et al., 1999)
Enzymes		
Aspartate-beta-Hydroxylase	Prostate cancer cells	(Kharaziha et al., 2015)
ATP citrate lyase	B cells	(Buschow et al., 2010)
ATPase	Neuroblastoma cells	(Keerthikumar et al., 2015)
Glucose-6-phosphate Isomerase	B cells	(Buschow et al., 2010)
Peroxiredoxin-1	Hepatocytes	(He et al., 2015)
Pyruvate kinase	Neuroblastoma cells	(Keerthikumar et al., 2015)
Other proteins		
Syndecan	Breast cancer cell	(Baietti et al., 2012)
Syntenin	Breast cancer cell	(Baietti et al., 2012)
Lipids		
Lipid rafts		

Composition	Cell Type	References
LBPA	Mastocytes	(Laulagnier et al., 2004)
	T cells	(Alonso et al., 2011)
Cholesterol	Astrocytes	(Toda et al., 2015)
	Glioblastoma cells	(Toda et al., 2015)
	Oligodendroglial cell	(Trajkovic et al., 2008)
Flotilin	Neurons	(Lachenal et al., 2011)
	Oligodendroglial cell	(Trajkovic et al., 2008)
Sphingomyelin	Oligodendroglial cell	(Trajkovic et al., 2008)
	Glioblastoma cells	(Toda et al., 2015)
	Mesenchymal stem cells	(Vallabhaneni et al., 2015)
Outher lipid domains		
Ceramide	Astrocytes	(Wang et al., 2012)
	Colorectal cancer cell	(Lydic et al., 2015)
	Mastocytes	(Laulagnier et al., 2004)
	Oligodendroglial cell	(Trajkovic et al., 2008)
Diacylglycerol (DG)	Dendritic cells	(Laulagnier et al., 2004)
	Colorectal cancer cell	(Lydic et al., 2015)
Glycerophosphatidyl Serine	Colorectal cancer cell	(Lydic et al., 2015)
Glycerophospho Choline	Colorectal cancer cell	(Lydic et al., 2015)
Glycosphingolipids	Prostate cancer cells	(Phuyal et al., 2015)
Phosphatidic acid	Prostate cancer cells	(Phuyal et al., 2015)
Phosphatidylcholine	Astrocytes	(Toda et al., 2015)
	Glioblastoma cells	(Toda et al., 2015)
Phosphatidylserine	Astrocytes	(Toda et al., 2015)
	Glioblastoma cells	(Toda et al., 2015)
	Prostate cancer cells	(Phuyal et al., 2015)

The topological features of exosomes limiting membrane strengthen the concept that they originate as MVBs ILVs. Peripheral membrane proteins that are found associated with the cytosolic face of endosomal membranes are trapped in the lumen of exosomes, which may also contain soluble proteins that are abundant in the cytosol. Moreover, the domains of transmembrane proteins directed to the lumen of organelles in the secretory pathway, or to the cell exterior, are exposed on the surface of exosomes (Figure 1). These features are crucial to many of the functions attributed to exosomes (Colombo et al., 2014).

However, the possibility that in certain cell types, such as T cells, exosome-like vesicles may bud from discrete domains of plasma membrane cannot be discarded (Booth et al., 2006) (see Figure 1). These domains are enriched in exosomal and endosomal proteins and serve as sites to outward vesicle budding, as demonstrated by fluorescence microscopy and electron microscopy analyses (Booth et al., 2006). These domains referred as

“endosome-like domains” contain cellular factors such as proteins of the ESCRT machinery (discussed below) and lipids that are implicated in the biogenesis of exosomes. These structures are also associated with exosomal markers, such as CD81 and CD63 (Booth et al., 2006). Furthermore, there is evidence that cargo proteins may be sorted to these endosome-like domains of the plasma membrane and are released in exosomes (Booth et al., 2006; Nguyen et al., 2003).

Exosomes and retroviral particles have the same membrane topology, similar sizes and share some similarities in the lipid and protein composition (Gould et al., 2003; Nguyen et al., 2003). Therefore, it is not surprising that the mechanisms of exosome formation, and the budding of enveloped viruses, in particular, HIV, have many common features. In fact, several enveloped viruses hijack host cell factors involved in exosome biogenesis during their life cycle (Votteler and Sundquist, 2013; Wurdinger et al., 2012). HIV-1 virion assembly occurs at the plasma membrane, within specialized membrane microdomains that are enriched in exosomal and endosomal proteins (Booth et al., 2006; Ono and Freed, 2004; Raposo et al., 2002). HIV-1 Gag polyprotein mediates all the essential events in virion assembly (Lingappa et al., 2014). Gag recruits several components of MVB biogenesis machinery to the plasma membrane during the process of HIV budding, some of which are crucial to HIV-1 production (Baumgärtel et al., 2011; Sundquist and Kräusslich, 2012). It has been shown that in T cells, HIV-1 Gag is recognized as an exosomal cargo and it is sorted to endosome-like domains on the plasma membrane where it is released as viral-like particles that are, in many ways, similar to exosomes (Booth et al., 2006; Nydegger et al., 2003). Therefore, a better understanding of the molecular mechanisms underlying the biogenesis of exosomes would certainly be relevant to studies in cell biology and pathophysiology, as in viral infections.

2. EXOSOME BIOGENESIS: MEMBRANE BENDING AND CARGO RECRUITMENT

The ESCRT Machinery

The formation of ILV by membrane remodeling, inward budding and scission into MVBs is critical to target specific transmembrane proteins, lipids and cytosol components to lysosomes for degradation (Hurley, 2010). The

events involved in the ILV formation are catalyzed by protein complexes and their accessory proteins that comprise the ESCRT machinery (Figure 2). The first description of the role of ESCRTs in MVB formation and sorting of cargo was in 2001 (Katzmann et al., 2001). Later, this machinery was implicated in other two key functions: budding of retrovirus (Demirov et al., 2002; Garrus et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2001; Patnaik et al., 2000; VerPlank et al., 2001) and membrane scission at ending stages of cytokinesis (Carlton and Martin-Serrano, 2007). Only more recently, the ESCRTs were reported to be involved in the biogenesis of exosomes and microvesicles (Gross et al., 2012; Tamai et al., 2010). The ESCRT machinery is composed of approximately thirty proteins that assemble into four complexes, denominated: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III. There are also accessory proteins, such as VTA1, ALIX and, the AAA ATPase VPS4. This machinery is recruited to early endosomes membrane in a sequential manner and is required for MVB biogenesis mediating cargo concentration and ILV formation (Hurley, 2010).

The conjugation of ubiquitin to the cytosolic tail of transmembrane proteins functions as a major sorting signal for entry into the ESCRT pathway, as ILV cargo. The sorting of ubiquitinated cargo begins in early endosomes subdomains enriched with ESCRT-0 (Bilodeau et al., 2002; Raiborg and Stenmark, 2002). ESCRT-0 consists of two subunits: HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) and STAM1/2 (signal transducing adaptor molecule 1/2), and two non-ESCRT associated proteins, Eps15 and clathrin. HRS binds to phosphatidylinositol 3-phosphate in the membrane of early endosomes allowing ESCRT-0 to be recruited to the endosomal membrane in a spacial and temporal-specific manner (Raiborg et al., 2001; Stahelin et al., 2002). ESCRT-I is recruited by ESCRT-0 proteins (i.e., HRS recruits TSG101, one of the subunits of ESCRT-I) (Bache et al., 2003). ESCRT-I was the first ESCRT complex to be described and consists of four subunits: TSG101, VPS28, VPS37, and MVB12 in metazoan (Katzmann et al., 2001; Morita et al., 2007; Oestreich et al., 2007). ESCRT-I also interacts with ESCRT-II, an heterotetramer in the shape of Y consisting of one subunit of VPS22 and VPS36 and two subunits VPS25 (Kostelansky et al., 2007). The interaction between ESCRT-I and II leads to the recruitment and assembly of the ESCRT-III complex that accumulates on the endosomal membrane, thus coordinating inward budding of the endosomal membrane with the concentration and recruitment of cargo into nascent ILVs (Figure 2) (Teis et al., 2010; Teo et al., 2004).

Figure 2. The ESCRT machinery and the formation of intraluminal vesicles and cargo concentration. The ESCRT machinery is essential for intraluminal vesicles (ILV) formation and cargo protein concentration, virus budding, and membrane scission during the final steps of cytokinesis. The ESCRT machinery associates with the endosomal system and mediates membrane curvature toward the endosomal lumen. The ESCRT machinery is composed of four protein complexes that work in a progressive way, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III. The ESCRT-0 consists of HRS and STAM and it is responsible for the recognition of ubiquitinated cargo proteins. ESCRT-0 binds and recruits ESCRT-I and transfers cargo to this complex. ESCRT-I is composed of four protein subunits: TSG101, VPS37, MBV12 and VPS28 and its responsible for cargo sorting. ESCRT-I binds and delivers cargo to ESCRT-II, another heterotetrameric complex composed of one subunit of VPS36, VPS22 and two subunits of VPS25. As ESCRT-I, ESCRT-II sorts cargo and transfers them to ESCRT-III in a mechanism that depends on the interaction between the two complexes. ESCRT-III forms a filament responsible for membrane bending that creates the ILV and concentrates the cargo inside it. ESCRT-III is composed of VPS20, VPS32, VPS24 and VPS2. ESCRT-III recruits the AAA ATPase VPS4 that catalyses the disassembly ESCRT-III from the membrane. ALIX is an ESCRT accessory protein able to interact with ESCRT-I and ESCRT-III and that has an important participation in ILV cargo selection.

ESCRT-III consists of four main subunits denominated: CHMP (charged multivesicular proteins) 2, 3, 4 and 6 (Babst et al., 2002). Finally, the last step of ILV budding is catalyzed by VPS4, an AAA ATPase that promotes the dissociation and recycling of the ESCRT machinery. VPS4 is specifically required for the final membrane scission event that allows the formation of ILVs (Lata et al., 2008; Scott et al., 2005; Wollert et al., 2009). Sahu et al., (2011) found the participation of hsc70 in the incorporation of soluble proteins into MVB ILVs and proposed that this chaperone contributes to the lysosomal turnover of soluble cytosolic proteins in an ESCRT-dependent manner (Sahu et al., 2011). The role of ESCRT machinery in exosomes biogenesis is not surprising since exosomes originate in MVBs. However, evidences suggest that other mechanisms may be involved in the MVBs biogenesis, independently of ESCRTs. Proposed mechanisms of exosome biogenesis, dependent or independent of ESCRTs are discussed below.

ESCRT-Dependent Mechanisms of Exosome Biogenesis

The most understood pathway of MVB biogenesis involves the role of the ESCRT machinery. Components of this machinery, such as ALIX and TSG101 were found in exosomes by proteomic analyses even before the discovery of their association with the ESCRTs (Théry et al., 2001). ALIX is a versatile protein with several functions in cells (Bissig and Gruenberg, 2014). This versatility is due to its “plastic” tridimensional structure and broad lipid and protein interaction network. ALIX comprises three structural domains: the N-terminal Bro1 domain, the central V-domain and a C-terminal proline-rich domain (PRD) (Fisher et al., 2007; Kim et al., 2005; Lee et al., 2007). Via the Bro1 and PRD domains, Alix physically interacts with TSG101 (ESCRT-I) and CHMP4 (ESCRT-III) and assists with ILVs formation and cargo sorting (Strack et al., 2003). Recent studies show that ALIX has an important function in exosomal biogenesis by interaction with syntenin, a small cytosolic protein of 298 amino acids (Baietti et al., 2012). Syntenin has two in tandem PDZ (postsynaptic density-95, discs-large, and zonulin-1) domains, with are protein interaction domains, often found in scaffolding proteins, and are necessary for syntenin membrane localization. These domains interact with syndecans (SDCs) (Grootjans et al., 2000; Zimmermann et al., 2001), CD63, and other transmembrane proteins (Latysheva et al., 2006; Luyten et al., 2008; McClelland et al., 2009). SDCs are proteins abundant in mammalian cells concentrated in particular unconventional lipids domains of membranes, i.e.,

in lipid rafts. SDCs contain an extracellular motif with an Heparan Sulfate (HS) chain that interacts with several partners (Bernfield et al., 1999; Rapraeger and Ott, 1998). HS chain seems to be important for exosomal release due to its self-oligomerization, a feature that confers to SDC molecules an increased affinity for syntenin complexes (Couchman, 2010; Lambaerts et al., 2009). The syntenin N-terminal domain interacts with both ALIX (V-domain) and SDCs to form a tripartite complex that mediates exosome biogenesis in an ESCRT-dependent manner (Figure 3) (Baietti et al., 2012).

Several studies have shown that members of the ESCRT machinery are required for exosome release. A RNAi-based screening to evaluate the individual role of 23 ESCRT proteins in HeLa-CIITA cells showed that both subunits of ESCRT-0 (HRS and STAM1) and ESCRT-I subunit TSG101 are required for exosomal release (Colombo et al., 2013). In addition, another group reported that TSG101 depletion also decreases the levels of SDC/syntenin/ALIX in exosomes (Baietti et al., 2012). Moreover, the release of exosomes by MCF-7 breast tumor cells was shown to be dependent on CHMP4a, b, c and CHMP2a subunits of the ESCRT-III complex (Baietti et al., 2012). The SDC/syntenin/ALIX exosomal production is also impaired in the absence of the VPS22 component of ESCRT-II (Baietti et al., 2012), and also in the absence of the ESCRT-associated proteins VPS4 and ALIX (Baietti et al., 2012). Intriguingly, the depletion of VPS4 in HeLa-CIITA cells increases the release of exosomes (Colombo et al., 2013). These findings shed light on the mechanisms of ILVs/exosome formation and illustrates that components of the ESCRT machinery may play distinct roles in the biogenesis and release of exosomes in different cells types.

ESCRT-Independent Mechanisms of Exosome Biogenesis

Interestingly, recent studies provide evidence that MVBs and exosomes are still produced in the absence of ESCRT machinery components (Babst, 2011). This type of biogenesis may involve tetraspanin proteins and certain lipid molecules, such as ceramide.

Ceramide

The existence of ESCRT-independent mechanisms for MVB formation is supported by studies showing that cells depleted of ESCRT subunits can still

release vesicles containing the tetraspanin CD63 (Stuffers et al., 2009). There is evidence that exosomal production in some cells requires the lipid ceramide and the neutral sphingomyelinase (nSMase2), an enzyme that converts sphingomyelin to ceramide, (Babst, 2011; Trajkovic et al., 2008) and it is considered an alternative pathway for sorting cargo into MVBs independently of the ESCRT machinery.

To demonstrate the role of sphingolipid ceramide in exosome biogenesis and understand how cargoes are sorted into ILVs, Trajkovic and colleagues studied the formation and release of exosomes containing the proteolipid protein (PLP) by oligodendroglial cell, a cell line that contains a large number of MVBs. They showed that PLP associates with microdomains of cargo segregation in endosomal membranes and that PLP is present in exosomes enriched in ceramide (Trajkovic et al., 2008). In this study, the authors also demonstrated that exosome incorporation of PLP and release does not require the ESCRT machinery. In contrast, the inhibition of nSMase2 reduces the release of PLP-containing exosomes.

Figure 3. The complex SDC/syntenin/ALIX in the biogenesis of exosomes. Schematic representation of the interaction between SDC, syntenin and ALIX during the formation of ILVs. Through this interaction, ALIX is targeted to ILVs and can recruit cargo in an alternative way to ALIX-ESCRT mediated recruitment, illustrated in Figure 2.

The role of ceramide as a trigger of exosomes biogenesis may be explained by its molecular structure. Ceramide is generated by activation of nSMase2 that hydrolyses sphingomyelinase on the cytosolic leaflet of the endosomal membrane (Tonnetti et al., 1999; Trajkovic et al., 2008; Yabu et al., 2008). The cone-shaped structure of ceramide might facilitate inward curvature of the MVBs membrane to form ILVs. Cargoes would then be segregated into subdomains of the endosomal membrane, originating ILV buds and these microdomains may contain higher concentration of sphingolipids from which ceramide is formed (Trajkovic et al., 2008). This process of exosome biogenesis and cargo recruitment does not seem to be depend on the function of the ESCRT machinery (Trajkovic et al., 2008), and emphasizes a critical role of specific lipids in exosome biogenesis.

Lysobisphosphatidic Acid (LBPA)

The lipid Bis(Monoacylglycero)Phosphate/Lysobisphosphatidic Acid (BMP/LBPA) is required for the formation of endosomal ILVs during MVB biogenesis (Falguières et al., 2008; Subra et al., 2007). It has been shown that LBPA interacts strongly with ALIX and that ALIX depletion reduces the accumulation of LBPA inside late endosomes (Chevallier et al., 2008; Matsuo et al., 2004). Moreover, a decrease of the LBPA levels in cells reduces the number of vesicles within MVBs (Chevallier et al., 2008). LBPA is enriched in late endosomes and lysosomes, but it is not detected in earlier endosomal compartments and its presence in exosome membranes is controversial (Chu et al., 2005; Kobayashi et al., 2002; Kobayashi et al., 1998; Matsuo et al., 2004; Wubbolts et al., 2003). LBPA can be formed by the phospholipase D (PLD) transphosphatidylation reaction. PLD2 is enriched in exosomes and its activity has been correlated with exosomal release (Laulagnier et al., 2004). Immunolabeling of LBPA in human B-lymphocytes showed an enrichment of this lipid in the inner leaflet of the lysosome membranes (Möbius et al., 2003). However, biochemical analyses to detect LBPA in exosomes failed to show any enrichment of LBPA in these vesicles (Laulagnier et al., 2004; Wubbolts et al., 2003), suggesting that some modification in the lipid composition might occur during the last stages of ILVs formation within MVBs and generation of exosomes (Record et al., 2014). In contrast, LBPA has been detected in exosomes released from mast cells and T cells (Alonso et al., 2011; Laulagnier et al., 2004) (Table 1).

Tetraspanins

EVs are rich in tetraspanins, a superfamily of proteins with more than 30 members, defined by the presence of four transmembrane domains. Most tetraspanins are highly glycosylated and have several transmembrane and cytosolic interaction partners (Andreu and Yáñez-Mó, 2014). While some tetraspanins are ubiquitously present in human tissues (CD9, CD63, CD81, CD82 and CD151), others are expressed only in specific tissues (Tssc6, CD37 and CD53). However, most studies on EVs proteomic profiling were performed using differential centrifugation that may yield mixed populations of EVs, and specific exosomal markers are still missing (Colombo et al., 2014). Exosomes are highly enriched with tetraspanins, and some of them have been proposed to be fine exosomal markers (Kim et al., 2013).

There is evidence that tetraspanins may induce membrane remodeling in an ESCRT-independent fashion, leading to cargo sorting and ILV formation in specific membrane microdomains enriched with these transmembrane proteins (Buschow et al., 2009; Escola et al., 1998; van Niel et al., 2011). Interestingly, in the absence of ESCRT machinery cells are capable of producing exosomes positive to CD63 (Stuffers et al., 2009; Trajkovic et al., 2008). It was also demonstrated that in antigen presenting cells the recruitment of MHC-II to exosomes occurs independent of ubiquitination but depends on its incorporation into CD9-enriched microdomains (Buschow et al., 2009). Additional experimental evidences are needed to define the mode of action of tetraspanins in exosomes biogenesis and cargo selection.

3. EXOSOME RELEASE

After the formation of ILVs, MVBs implicated in exosome release must be targeted to the plasma membrane to which they will dock and fuse, allowing the release of exosomes to the extracellular milieu. The existence of signals driving exosome release and the molecular machinery controlling these late events in exosome biogenesis are not completely understood. However, results from recent studies have shed light on these processes (Cocucci and Meldolesi, 2015; Colombo et al., 2014). It is now evident that the cytoskeleton (actin and microtubules) and associated molecular motors (myosins and kinesins), as well as Rab proteins (a family of small GTPases), and membrane fusion machinery (SNAREs) play important roles in exosome release.

Is Exosome Release Signal Dependent?

Most studies about exosome release were performed under constitutive conditions, i.e., without the use of specific stimuli that could induce exosome release. In fact, most cells are thought to release exosomes at steady state. However, some studies have identified specific stimulus that is capable of inducing exosome release by certain cell types. Examples of such stimuli are modifications in the intracellular Ca^{2+} concentration, membrane depolarization of neuronal cells and activation of immune cells. However, to distinguish whether those stimuli increase the release of exosomes, as opposed to other types of EVs may be challenging.

Modification in the intracellular Ca^{2+} levels remarkably induced exosome release in several cell types. These include human erythroleukemia cells (Savina et al., 2003), mast cells (Valadi et al., 2007), oligodendroglial cells (Krämer-Albers et al., 2007), dendritic cells (DCs) (Montecalvo et al., 2012) and cortical neurons (Fauré et al., 2006). The depolarization of rat cortical neurons mediated by K^{+} (Fauré et al., 2006) and glutamatergic stimulus modulated by synaptic AMPA receptor activity (Lachenal et al., 2011) also have been reported to stimulate the release of exosomes. The release of exosomes associated with immune responses was observed for DCs presenting antigens to CD4^{+} T lymphocytes (Buschow et al., 2009) and after the activation of B and T lymphocytes (Blanchard et al., 2002; Muntasell et al., 2007). Despite all these examples of signal-induced release of exosomes, the underlying intracellular mechanisms have not yet been described.

Rab GTPases Regulate Exosomes Release

The small monomeric GTPases of the Rab (Ras-related proteins in brain) family are major regulators of vesicle targeting to specific acceptor compartments. Several studies found that Rab proteins are also master regulators of exosome release (Hutagalung and Novick, 2011). Rab GTPases comprise a family of more than 60 conserved members in eukaryotic cells, and each Rab protein is associated with a particular compartment or vesicle type. Rab proteins reversibly associate with the membrane of a vesicle and/or cellular compartment and regulate major steps involved in vesicular transport including membrane budding, transport along cytoskeletal filaments, tethering and fusion with target membrane. Those processes depend on cycles of Rab

activation (association with GTP) and Rab inactivation (association with GDP) (Stenmark, 2009).

Studies interfering with Rabs activity revealed the importance of these proteins in exosome release. At least four Rab proteins were found to be directly involved in the release of exosomes: Rab11, Rab27a, Rab27b and Rab35 (Figure 1). Rab11 activity was shown to be essential for exosomes release in erythroleukemia cell line K562 (Savina et al., 2002) and release of microvesicles by *Drosophila* S2 cells (Beckett et al., 2013). Rab27a and Rab27b were shown to be important for the MVB delivery to the plasma membrane and are crucial for exosomes release in different cells type, including murine melanoma, mammary carcinoma, and HeLa CIITA cells (Bobrie et al., 2012; Ostrowski et al., 2010; Peinado et al., 2012). Rab 35 activity has also been implicated in the release of exosomes in an oligodendroglial cancer cell line and primary oligodendrocytes (Frühbeis et al., 2013; Hsu et al., 2010). Interestingly, Rab7, which has been classically implicated in the fusion of MVBs with lysosomes (Bucci et al., 2000), was shown also to play a role in the fusion of MVBs with the plasma membrane (Baietti et al., 2012). Specifically, it was found that in cells depleted of Rab7, the release of SDC/syntenin/ALIX exosomes was reduced (Baietti et al., 2012). It is important to highlight that despite the importance of Rab11, Rab27a, Rab27b, and Rab35 in exosomes release, the selective inhibition of one of these GTPases only partially blocked this process in the majority of the studies. This partial blockage may be explained by the existence of redundant pathways for exosome release controlled by different Rab proteins, or that different population of MVB contributes with the release of exosomes via pathways controlled by distinct Rabs.

The Role of Cytoskeleton and SNAREs in Exosomes Release

The subcellular localization of MVBs, and their targeting to the plasma membrane depends on the interaction of these endosomes with the actin and/or microtubule cytoskeleton, processes mediated by Rab and Rab-effector proteins. Rab-effectors associated with the cytoskeleton control the recruitment of motor proteins that move along cytoskeleton filaments (Hutagalung and Novick, 2011). For example, Rab11 recruits myosin Vb by using de Rab-effector FIP2 or it can recruit dynein using Rab-effector FIP3 (Hales et al., 2001; Hales et al., 2002; Horgan et al., 2010). The importance of actin cytoskeleton for the release of exosomes from cancer and immune cells

has also been demonstrated. Actin-rich domains near the cell surface are docking sites for MVBs and regulate exosomes secretion in some cancer cells (Hoshino et al., 2013). In a similar way, during the immunological synapses, MVBs may move along actin filaments for exosome release and antigen presentation at the synapse cleft (Mittelbrunn et al., 2011). Finally, the targeting of MVBs from the central region of the cell to the plasma membrane requires the activity of kinesins that move the organelle toward microtubule plus ends (Alonso et al., 2011).

Once docked at the plasma membrane the physical fusion between the MVB limiting membrane and the plasma membrane is required to allow ILVs release, a process mediated by SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) (Jahn and Scheller, 2006). In this process, vSNAREs (vesicular SNARE) are associated with MVBs and cognate tSNAREs (target SNARE) are associated with the plasma membrane. Despite the description of SNAREs involved in several steps of vesicular trafficking, there are only a few studies describing the participation of SNAREs in the release of exosomes. The vSNARE VAMP7 was found to regulate the MVB fusion with the plasma membrane and the release of exosomes in human leukemia K562 cell line (Fader et al., 2009). However, VAMP7 does not seem to play a role in exosomes release from MDCK cells (Proux-Gillardeaux et al., 2007). On the other hand, a study with HEK293 described the importance of the R-SNARE YKT6 on the release of exosomes (Gross et al., 2012). The identification of specific SNAREs controlling this important step in exosome release will contribute to shed further light on the unique origin of this type of EVs.

4. THE DIVERSITY OF MVBs

As discussed above, the ILVs of MVBs may have two main fates: to be secreted to the extracellular milieu, as exosomes; or to be degraded within lysosomes. Despite the importance of this decision, it is currently unclear whether the molecular determinants for targeting ILVs through either pathway are acquired by MVBs during their biogenesis after these organelles are completely formed or both. Are there different populations of MVBs that mediate either ILV lysosome degradation or exosome release? In fact, there is a strong body of evidence indicating that distinct subpopulations of MVBs may co-exist in a given cell.

In sympathetic neurons and rat PC12 cells, the p75 neurotrophin receptor, also known as NGFR, escapes degradation in lysosomes after cell depolarization induced by KCl and is instead released in exosomes (Escudero et al., 2014). It was observed that after the stimulus the degradation of p75 was impaired and the receptor accumulated in MVBs (Escudero et al., 2014). Because p75 degradation is blocked it is likely that the MVBs, in which p75 accumulates, are not destined to deliver cargo to lysosomes, and instead it delivers to the plasma membrane.

A different study reported that wortmannin, a phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) inhibitor, inhibits budding of ILVs in endosomes, and upon EGF stimulation, EGFR remained "trapped" on the limiting membrane of endosomes (Futter et al., 2001). These results demonstrate the importance of PI3K in the biogenesis of MVBs involved in EGFR downregulation. In contrast, PI3K was not essential for the formation of MVBs containing LBPA (Bright et al., 2001). Interestingly, it was observed that EGF and EGFR can be found in MVBs that are negative for LBPA (White et al., 2006). These results sustain the existence of two subpopulations of MVBs that differ by the presence or absence of LBPA.

As discussed before, exosomes are enriched with certain lipids, such as cholesterol (Llorente et al., 2013), whereas lysosomes are poor in cholesterol (Lange et al., 1998; Schoer et al., 2000; Sokol et al., 1988). Electron microscopy assays, using a biotinylated form of the toxin perfringolysin O from *Clostridium perfringens* to localize cholesterol (which binds the toxin) (Iwamoto et al., 1997), showed that two types of MVBs with similar morphology differ in their cholesterol content amounts (Möbius et al., 2002). The authors proposed that MVB populations rich in cholesterol would fuse with the plasma membrane to secrete exosomes, and the cholesterol-poor population would be destined to fuse with lysosomes for ILV degradation (Möbius et al., 2002). As discussed above, Rab proteins may be the key molecules distinguishing between different populations of MVBs and controlling their fates.

CONCLUSION

Exosomes are emerging as critical mediators of intercellular communication. These membranous nanovesicles are present in virtually all bodily fluids, such as blood, urine, saliva, breast milk and semen; and have been implicated in a variety of physiological and pathological processes.

Exosomes can also be hijacked by viruses, and be used as “Trojan horses” to evade immune surveillance and deliver virulent factors to uninfected cells. Given the importance of exosomes in health and disease, it is crucial to achieving a clear understand about the cellular machinery and mechanisms controlling exosomes biogenesis and release. The role of ESCRTs and ESCRT-accessory proteins in the biogenesis of exosomes is clear, however, the findings that exosomes may also be generated in the absence of ESCRTs calls for further investigation into the role played by specific lipids and proteins, such as tetraspanins, in this process. A better understanding on how specific cargoes are loaded into exosomes also awaits further clarification. What are the sorting signals and sorting adaptors involved in this recruitment? Another central topic in the field is how MVBs acquire their identity and which are the Rabs, Rab-effectors and SNARES controlling the distinct fates of MVBs. Despite the many exciting findings published in the last years, future work on the exosome field will need to address these and other basic cell biology questions.

REFERENCES

- Admyre, C., J. Grunewald, J. Thyberg, S. Gripenbäck, G. Tornling, A. Eklund, A. Scheynius, and S. Gabrielsson, 2003, Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid: *Eur Respir J*, v. 22, p. 578-83.
- Alonso, R., C. Mazzeo, M. C. Rodriguez, M. Marsh, A. Fraile-Ramos, V. Calvo, A. Avila-Flores, I. Merida, and M. Izquierdo, 2011, Diacylglycerol kinase α regulates the formation and polarisation of mature multivesicular bodies involved in the secretion of Fas ligand-containing exosomes in T lymphocytes: *Cell Death Differ*, v. 18, p. 1161-73.
- Andreu, Z., and M. Yáñez-Mó, 2014, Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function: *Front Immunol*, v. 5, p. 442.
- Atay, S., C. Gercel-Taylor, M. Kesimer, and D. D. Taylor, 2011, Morphologic and proteomic characterization of exosomes released by cultured extravillous trophoblast cells: *Exp Cell Res*, v. 317, p. 1192-202.
- Babst, M., 2011, MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between: *Curr Opin Cell Biol*, v. 23, p. 452-7.

- Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr, 2002, Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting: *Dev Cell*, v. 3, p. 271-82.
- Bache, K. G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark, 2003, Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes: *J Cell Biol*, v. 162, p. 435-42.
- Baietti, M. F., Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann, and G. David, 2012, Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes: *Nat Cell Biol*, v. 14, p. 677-85.
- Baumgärtel, V., S. Ivanchenko, A. Dupont, M. Sergeev, P. W. Wiseman, H. G. Kräusslich, C. Bräuchle, B. Müller, and D. C. Lamb, 2011, Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component: *Nat Cell Biol*, v. 13, p. 469-74.
- Beckett, K., S. Monier, L. Palmer, C. Alexandre, H. Green, E. Bonneil, G. Raposo, P. Thibault, R. Le Borgne, and J. P. Vincent, 2013, Drosophila S2 cells secrete wingless on exosome-like vesicles but the wingless gradient forms independently of exosomes: *Traffic*, v. 14, p. 82-96.
- Bernfield, M., M. Götte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, and M. Zako, 1999, Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans: *Annu Rev Biochem*, v. 68, p. 729-77.
- Bilodeau, P. S., J. L. Urbanowski, S. C. Winistorfer, and R. C. Piper, 2002, The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting: *Nat Cell Biol*, v. 4, p. 534-9.
- Bissig, C., and J. Gruenberg, 2014, ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland: *Trends Cell Biol*, v. 24, p. 19-25.
- Blanchard, N., D. Lankar, F. Faure, A. Regnault, C. Dumont, G. Raposo, and C. Hivroz, 2002, TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex: *J Immunol*, v. 168, p. 3235-41.
- Bobrie, A., S. Krumeich, F. Rey, C. Recchi, L. F. Moita, M. C. Seabra, M. Ostrowski, and C. Théry, 2012, Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression: *Cancer Res*, v. 72, p. 4920-30.
- Booth, A. M., Y. Fang, J. K. Fallon, J. M. Yang, J. E. Hildreth, and S. J. Gould, 2006, Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane: *J Cell Biol*, v. 172, p. 923-35.
- Bright, N. A., M. R. Lindsay, A. Stewart, and J. P. Luzio, 2001, The relationship between luminal and limiting membranes in swollen late

- endocytic compartments formed after wortmannin treatment or sucrose accumulation: *Traffic*, v. 2, p. 631-42.
- Bucci, C., P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, and B. van Deurs, 2000, Rab7: a key to lysosome biogenesis: *Mol Biol Cell*, v. 11, p. 467-80.
- Buschow, S. I., E. N. Nolte-'t Hoen, G. van Niel, M. S. Pols, T. ten Broeke, M. Lauwen, F. Ossendorp, C. J. Melief, G. Raposo, R. Wubbolts, M. H. Wauben, and W. Stoorvogel, 2009, MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways: *Traffic*, v. 10, p. 1528-42.
- Buschow, S. I., B. W. van Balkom, M. Aalberts, A. J. Heck, M. Wauben, and W. Stoorvogel, 2010, MHC class II-associated proteins in B-cell exosomes and potential functional implications for exosome biogenesis: *Immunol Cell Biol*, v. 88, p. 851-6.
- Caby, M. P., D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo, and C. Bonnerot, 2005, Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma: *Int Immunol*, v. 17, p. 879-87.
- Carayon, K., K. Chaoui, E. Ronzier, I. Lazar, J. Bertrand-Michel, V. Roques, S. Balor, F. Terce, A. Lopez, L. Salomé, and E. Joly, 2011, Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation: *J Biol Chem*, v. 286, p. 34426-39.
- Carlton, J. G., and J. Martin-Serrano, 2007, Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery: *Science*, v. 316, p. 1908-12.
- Chavez-Muñoz, C., J. Morse, R. Kilani, and A. Ghahary, 2008, Primary human keratinocytes externalize stratifin protein via exosomes: *J Cell Biochem*, v. 104, p. 2165-73.
- Chevallier, J., Z. Chamoun, G. Jiang, G. Prestwich, N. Sakai, S. Matile, R. G. Parton, and J. Gruenberg, 2008, Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels: *J Biol Chem*, v. 283, p. 27871-80.
- Chu, Z., D. P. Witte, and X. Qi, 2005, Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes: *Exp Cell Res*, v. 303, p. 300-7.
- Cocucci, E., and J. Meldolesi, 2015, Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles: *Trends Cell Biol*, v. 25, p. 364-72.
- Colombo, M., C. Moita, G. van Niel, J. Kowal, J. Vigneron, P. Benaroch, N. Manel, L. F. Moita, C. Théry, and G. Raposo, 2013, Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles: *J Cell Sci*, v. 126, p. 5553-65.

- Colombo, M., G. Raposo, and C. Théry, 2014, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 30, p. 255-89.
- Couchman, J. R., 2010, Transmembrane signaling proteoglycans: *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 26, p. 89-114.
- Dai, S., T. Wan, B. Wang, X. Zhou, F. Xiu, T. Chen, Y. Wu, and X. Cao, 2005, More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA)-specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells: *Clin Cancer Res*, v. 11, p. 7554-63.
- de Carvalho, J. V., R. O. de Castro, E. Z. da Silva, P. P. Silveira, M. E. da Silva-Januário, E. Arruda, M. C. Jamur, C. Oliver, R. S. Aguiar, and L. L. daSilva, 2014, Nef neutralizes the ability of exosomes from CD4+ T cells to act as decoys during HIV-1 infection: *PLoS One*, v. 9, p. e113691.
- Demirov, D. G., A. Ono, J. M. Orenstein, and E. O. Freed, 2002, Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function: *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 99, p. 955-60.
- Escola, J. M., M. J. Kleijmeer, W. Stoorvogel, J. M. Griffith, O. Yoshie, and H. J. Geuze, 1998, Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes: *J Biol Chem*, v. 273, p. 20121-7.
- Escudero, C. A., O. M. Lazo, C. Galleguillos, J. I. Parraguez, M. A. Lopez-Verrilli, C. Cabeza, L. Leon, U. Saeed, C. Retamal, A. Gonzalez, M. P. Marzolo, B. D. Carter, F. A. Court, and F. C. Bronfman, 2014, The p75 neurotrophin receptor evades the endolysosomal route in neuronal cells, favouring multivesicular bodies specialised for exosomal release: *J Cell Sci*, v. 127, p. 1966-79.
- Fader, C. M., D. G. Sánchez, M. B. Mestre, and M. I. Colombo, 2009, TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways: *Biochim Biophys Acta*, v. 1793, p. 1901-16.
- Falguières, T., P. P. Luyet, C. Bissig, C. C. Scott, M. C. Velluz, and J. Gruenberg, 2008, In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101: *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 4942-55.
- Fauré, J., G. Lachenal, M. Court, J. Hirrlinger, C. Chatellard-Causse, B. Blot, J. Grange, G. Schoehn, Y. Goldberg, V. Boyer, F. Kirchhoff, G. Raposo,

- J. Garin, and R. Sadoul, 2006, Exosomes are released by cultured cortical neurones: *Mol Cell Neurosci*, v. 31, p. 642-8.
- Fisher, R. D., H. Y. Chung, Q. Zhai, H. Robinson, W. I. Sundquist, and C. P. Hill, 2007, Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding: *Cell*, v. 128, p. 841-52.
- Frühbeis, C., D. Fröhlich, W. P. Kuo, J. Amphornrat, S. Thilemann, A. S. Saab, F. Kirchhoff, W. Möbius, S. Goebbels, K. A. Nave, A. Schneider, M. Simons, M. Klugmann, J. Trotter, and E. M. Krämer-Albers, 2013, Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication: *PLoS Biol*, v. 11, p. e1001604.
- Futter, C. E., L. M. Collinson, J. M. Backer, and C. R. Hopkins, 2001, Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes: *J Cell Biol*, v. 155, p. 1251-64.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Côté, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist, 2001, Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding: *Cell*, v. 107, p. 55-65.
- Gould, S. J., A. M. Booth, and J. E. Hildreth, 2003, The Trojan exosome hypothesis: *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 100, p. 10592-7.
- Grootjans, J. J., G. Reekmans, H. Ceulemans, and G. David, 2000, Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin: *J Biol Chem*, v. 275, p. 19933-41.
- Gross, J. C., V. Chaudhary, K. Bartscherer, and M. Boutros, 2012, Active Wnt proteins are secreted on exosomes: *Nat Cell Biol*, v. 14, p. 1036-45.
- Hales, C. M., R. Griner, K. C. Hobdy-Henderson, M. C. Dorn, D. Hardy, R. Kumar, J. Navarre, E. K. Chan, L. A. Lapierre, and J. R. Goldenring, 2001, Identification and characterization of a family of Rab11-interacting proteins: *J Biol Chem*, v. 276, p. 39067-75.
- Hales, C. M., J. P. Vaerman, and J. R. Goldenring, 2002, Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling: *J Biol Chem*, v. 277, p. 50415-21.
- He, M., H. Qin, T. C. Poon, S. C. Sze, X. Ding, N. N. Co, S. M. Ngai, T. F. Chan, and N. Wong, 2015, Hepatocellular carcinoma-derived exosomes promote motility of immortalized hepatocyte through transfer of oncogenic proteins and RNAs: *Carcinogenesis*, v. 36, p. 1008-18.
- Hegmans, J. P., M. P. Bard, A. Hemmes, T. M. Luiders, M. J. Kleijmeer, J. B. Prins, L. Zitvogel, S. A. Burgers, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht, 2004, Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells: *Am J Pathol*, v. 164, p. 1807-15.

- Heijnen, H. F., A. E. Schiel, R. Fijnheer, H. J. Geuze, and J. J. Sixma, 1999, Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules: *Blood*, v. 94, p. 3791-9.
- Horgan, C. P., S. R. Hanscom, R. S. Jolly, C. E. Futter, and M. W. McCaffrey, 2010, Rab11-FIP3 links the Rab11 GTPase and cytoplasmic dynein to mediate transport to the endosomal-recycling compartment: *J Cell Sci*, v. 123, p. 181-91.
- Hoshino, D., K. C. Kirkbride, K. Costello, E. S. Clark, S. Sinha, N. Grega-Larson, M. J. Tyska, and A. M. Weaver, 2013, Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior: *Cell Rep*, v. 5, p. 1159-68.
- Hsu, C., Y. Morohashi, S. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M. A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Grønberg, W. Möbius, J. Rhee, F. A. Barr, and M. Simons, 2010, Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C: *J Cell Biol*, v. 189, p. 223-32.
- Hurley, J. H., 2010, The ESCRT complexes: *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 45, p. 463-87.
- Hutagalung, A. H., and P. J. Novick, 2011, Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology: *Physiol Rev*, v. 91, p. 119-49.
- Iwamoto, M., I. Morita, M. Fukuda, S. Murota, S. Ando, and Y. Ohno-Iwashita, 1997, A biotinylated perfringolysin O derivative: a new probe for detection of cell surface cholesterol: *Biochim Biophys Acta*, v. 1327, p. 222-30.
- Jahn, R., and R. H. Scheller, 2006, SNAREs--engines for membrane fusion: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 7, p. 631-43.
- Johnstone, R. M., A. Mathew, A. B. Mason, and K. Teng, 1991, Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins: *J Cell Physiol*, v. 147, p. 27-36.
- Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr, 2001, Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I: *Cell*, v. 106, p. 145-55.
- Keerthikumar, S., L. Gangoda, M. Liem, P. Fonseka, I. Atukorala, C. Ozcitti, A. Mechler, C. G. Adda, C. S. Ang, and S. Mathivanan, 2015, Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes: *Oncotarget*, v. 6, p. 15375-96.
- Kharaziha, P., D. Chioureas, D. Rutishauser, G. Baltatzis, L. Lennartsson, P. Fonseca, A. Azimi, K. Hultenby, R. Zubarev, A. Ullén, J. Yachnin, S.

- Nilsson, and T. Panaretakis, 2015, Molecular profiling of prostate cancer derived exosomes may reveal a predictive signature for response to docetaxel: *Oncotarget*, v. 6, p. 21740-54.
- Kim, D. K., B. Kang, O. Y. Kim, D. S. Choi, J. Lee, S. R. Kim, G. Go, Y. J. Yoon, J. H. Kim, S. C. Jang, K. S. Park, E. J. Choi, K. P. Kim, D. M. Desiderio, Y. K. Kim, J. Lötvall, D. Hwang, and Y. S. Gho, 2013, EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles: *J Extracell Vesicles*, v. 2.
- Kim, J., S. Sitaraman, A. Hierro, B. M. Beach, G. Odorizzi, and J. H. Hurley, 2005, Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain: *Dev Cell*, v. 8, p. 937-47.
- Kobayashi, T., M. H. Beuchat, J. Chevallier, A. Makino, N. Mayran, J. M. Escola, C. Lebrand, P. Cosson, and J. Gruenberg, 2002, Separation and characterization of late endosomal membrane domains: *J Biol Chem*, v. 277, p. 32157-64.
- Kobayashi, T., E. Stang, K. S. Fang, P. de Moerloose, R. G. Parton, and J. Gruenberg, 1998, A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function: *Nature*, v. 392, p. 193-7.
- Kostelansky, M. S., C. Schluter, Y. Y. Tam, S. Lee, R. Ghirlando, B. Beach, E. Conibear, and J. H. Hurley, 2007, Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer: *Cell*, v. 129, p. 485-98.
- Krämer-Albers, E. M., N. Bretz, S. Tenzer, C. Winterstein, W. Möbius, H. Berger, K. A. Nave, H. Schild, and J. Trotter, 2007, Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?: *Proteomics Clin Appl*, v. 1, p. 1446-61.
- Lachenal, G., K. Pernet-Gallay, M. Chivet, F. J. Hemming, A. Belly, G. Bodon, B. Blot, G. Haase, Y. Goldberg, and R. Sadoul, 2011, Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity: *Mol Cell Neurosci*, v. 46, p. 409-18.
- Lambaerts, K., S. A. Wilcox-Adelman, and P. Zimmermann, 2009, The signaling mechanisms of syndecan heparan sulfate proteoglycans: *Curr Opin Cell Biol*, v. 21, p. 662-9.
- Lange, Y., J. Ye, and T. L. Steck, 1998, Circulation of cholesterol between lysosomes and the plasma membrane: *J Biol Chem*, v. 273, p. 18915-22.
- Lata, S., G. Schoehn, A. Jain, R. Pires, J. Piehler, H. G. Gottlinger, and W. Weissenhorn, 2008, Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4: *Science*, v. 321, p. 1354-7.

- Latysheva, N., G. Muratov, S. Rajesh, M. Padgett, N. A. Hotchin, M. Overduin, and F. Berditchevski, 2006, Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63: *Mol Cell Biol*, v. 26, p. 7707-18.
- Laulagnier, K., C. Motta, S. Hamdi, S. Roy, F. Fauvelle, J. F. Pageaux, T. Kobayashi, J. P. Salles, B. Perret, C. Bonnerot, and M. Record, 2004, Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization: *Biochem J*, v. 380, p. 161-71.
- Lazar, I., E. Clement, M. Ducoux-Petit, L. Denat, V. Soldan, S. Dauvillier, S. Balor, O. Burlet-Schiltz, L. Larue, C. Muller, and L. Nieto, 2015, Proteome characterization of melanoma exosomes reveals a specific signature for metastatic cell lines: *Pigment Cell Melanoma Res*, v. 28, p. 464-75.
- Lee, S., A. Joshi, K. Nagashima, E. O. Freed, and J. H. Hurley, 2007, Structural basis for viral late-domain binding to Alix: *Nat Struct Mol Biol*, v. 14, p. 194-9.
- Liang, B., P. Peng, S. Chen, L. Li, M. Zhang, D. Cao, J. Yang, H. Li, T. Gui, X. Li, and K. Shen, 2013, Characterization and proteomic analysis of ovarian cancer-derived exosomes: *J Proteomics*, v. 80, p. 171-82.
- Lingappa, J. R., J. C. Reed, M. Tanaka, K. Chutiraka, and B. A. Robinson, 2014, How HIV-1 Gag assembles in cells: Putting together pieces of the puzzle: *Virus Res*, v. 193, p. 89-107.
- Llorente, A., T. Skotland, T. Sylvnne, D. Kauhanen, T. Rg, A. Orowski, I. Vattulainen, K. Ekroos, and K. Sandvig, 2013, Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells: *Biochim Biophys Acta*, v. 1831, p. 1302-9.
- Luyten, A., E. Mortier, C. Van Campenhout, V. Taelman, G. Degeest, G. Wuytens, K. Lambaerts, G. David, E. J. Bellefroid, and P. Zimmermann, 2008, The postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens protein syntenin directly interacts with frizzled 7 and supports noncanonical Wnt signaling: *Mol Biol Cell*, v. 19, p. 1594-604.
- Lydic, T. A., S. Townsend, C. G. Adda, C. Collins, S. Mathivanan, and G. E. Reid, 2015, Rapid and comprehensive ‘shotgun’ lipidome profiling of colorectal cancer cell derived exosomes: *Methods*, v. 87, p. 83-95.
- Lynch, S., S. G. Santos, E. C. Campbell, A. M. Nimmo, C. Botting, A. Prescott, A. N. Antoniou, and S. J. Powis, 2009, Novel MHC class I structures on exosomes: *J Immunol*, v. 183, p. 1884-91.

- Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz, 2001, HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress: *Nat Med*, v. 7, p. 1313-9.
- Matsuo, H., J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Fauré, N. S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R. G. Parton, F. Vilbois, and J. Gruenberg, 2004, Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization: *Science*, v. 303, p. 531-4.
- McClelland, A. C., S. I. Sheffler-Collins, M. S. Kayser, and M. B. Dalva, 2009, Ephrin-B1 and ephrin-B2 mediate EphB-dependent presynaptic development via syntenin-1: *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, p. 20487-92.
- Mittelbrunn, M., C. Gutiérrez-Vázquez, C. Villarroya-Beltri, S. González, F. Sánchez-Cabo, M. González, A. Bernad, and F. Sánchez-Madrid, 2011, Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells: *Nat Commun*, v. 2, p. 282.
- Montecalvo, A., A. T. Larregina, W. J. Shufesky, D. B. Stolz, M. L. Sullivan, J. M. Karlsson, C. J. Baty, G. A. Gibson, G. Erdos, Z. Wang, J. Milosevic, O. A. Tkacheva, S. J. Divito, R. Jordan, J. Lyons-Weiler, S. C. Watkins, and A. E. Morelli, 2012, Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes: *Blood*, v. 119, p. 756-66.
- Morita, E., V. Sandrin, S. L. Alam, D. M. Eckert, S. P. Gygi, and W. I. Sundquist, 2007, Identification of human MVB12 proteins as ESCRT-I subunits that function in HIV budding: *Cell Host Microbe*, v. 2, p. 41-53.
- Muntasell, A., A. C. Berger, and P. A. Roche, 2007, T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes: *EMBO J*, v. 26, p. 4263-72.
- Möbius, W., Y. Ohno-Iwashita, E. G. van Donselaar, V. M. Oorschot, Y. Shimada, T. Fujimoto, H. F. Heijnen, H. J. Geuze, and J. W. Slot, 2002, Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O: *J Histochem Cytochem*, v. 50, p. 43-55.
- Möbius, W., E. van Donselaar, Y. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, H. F. Heijnen, J. W. Slot, and H. J. Geuze, 2003, Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway: *Traffic*, v. 4, p. 222-31.
- Nguyen, D. G., A. Booth, S. J. Gould, and J. E. Hildreth, 2003, Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway: *J Biol Chem*, v. 278, p. 52347-54.

- Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali, 2003, HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes: *Traffic*, v. 4, p. 902-10.
- Oestreich, A. J., B. A. Davies, J. A. Payne, and D. J. Katzmann, 2007, Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway: *Mol Biol Cell*, v. 18, p. 646-57.
- Ono, A., and E. O. Freed, 2004, Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body: *J Virol*, v. 78, p. 1552-63.
- Ostrowski, M., N. B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C. F. Moita, K. Schauer, A. N. Hume, R. P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M. C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L. F. Moita, and C. Thery, 2010, Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway: *Nat Cell Biol*, v. 12, p. 19-30; sup pp 1-13.
- Patnaik, A., V. Chau, and J. W. Wills, 2000, Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery: *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 97, p. 13069-74.
- Peinado, H., M. Alečković, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. García-Santos, C. Ghajar, A. Nitadori-Hoshino, C. Hoffman, K. Badal, B. A. Garcia, M. K. Callahan, J. Yuan, V. R. Martins, J. Skog, R. N. Kaplan, M. S. Brady, J. D. Wolchok, P. B. Chapman, Y. Kang, J. Bromberg, and D. Lyden, 2012, Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET: *Nat Med*, v. 18, p. 883-91.
- Phuyal, S., T. Skotland, N. P. Hessvik, H. Simolin, A. Øverbye, A. Brech, R. G. Parton, K. Ekroos, K. Sandvig, and A. Llorente, 2015, The ether lipid precursor hexadecylglycerol stimulates the release and changes the composition of exosomes derived from PC-3 cells: *J Biol Chem*, v. 290, p. 4225-37.
- Pienimaeki-Roemer, A., K. Kuhlmann, A. Böttcher, T. Konovalova, A. Black, E. Orsó, G. Liebisch, M. Ahrens, M. Eisenacher, H. E. Meyer, and G. Schmitz, 2015, Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets: *Transfusion*, v. 55, p. 507-21.
- Proux-Gillardeaux, V., G. Raposo, T. Irinopoulou, and T. Galli, 2007, Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration: *Biol Cell*, v. 99, p. 261-71.
- Raiborg, C., B. Bremnes, A. Mehlum, D. J. Gillingham, A. D'Arrigo, E. Stang, and H. Stenmark, 2001, FYVE and coiled-coil domains determine the

- specific localisation of Hrs to early endosomes: *J Cell Sci*, v. 114, p. 2255-63.
- Raiborg, C., and H. Stenmark, 2002, Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins: *Cell Struct Funct*, v. 27, p. 403-8.
- Raiborg, C., and H. Stenmark, 2009, The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins: *Nature*, v. 458, p. 445-52.
- Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze, 2002, Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments: *Traffic*, v. 3, p. 718-29.
- Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze, 1996, B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles: *J Exp Med*, v. 183, p. 1161-72.
- Raposo, G., and W. Stoorvogel, 2013, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends: *J Cell Biol*, v. 200, p. 373-83.
- Rapraeger, A. C., and V. L. Ott, 1998, Molecular interactions of the syndecan core proteins: *Curr Opin Cell Biol*, v. 10, p. 620-8.
- Record, M., K. Carayon, M. Poirot, and S. Silvente-Poirot, 2014, Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes: *Biochim Biophys Acta*, v. 1841, p. 108-20.
- Rieu, S., C. Géminard, H. Rabesandratana, J. Sainte-Marie, and M. Vidal, 2000, Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin $\alpha 4 \beta 1$: *Eur J Biochem*, v. 267, p. 583-90.
- Sahu, R., S. Kaushik, C. C. Clement, E. S. Cannizzo, B. Scharf, A. Follenzi, I. Poticchio, E. Nieves, A. M. Cuervo, and L. Santambrogio, 2011, Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes: *Dev Cell*, v. 20, p. 131-9.
- Savina, A., M. Furlán, M. Vidal, and M. I. Colombo, 2003, Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells: *J Biol Chem*, v. 278, p. 20083-90.
- Savina, A., M. Vidal, and M. I. Colombo, 2002, The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11: *J Cell Sci*, v. 115, p. 2505-15.
- Schoer, J. K., A. M. Gallegos, A. L. McIntosh, O. Starodub, A. B. Kier, J. T. Billheimer, and F. Schroeder, 2000, Lysosomal membrane cholesterol dynamics: *Biochemistry*, v. 39, p. 7662-77.
- Scott, A., H. Y. Chung, M. Gonciarz-Swiatek, G. C. Hill, F. G. Whitby, J. Gaspar, J. M. Holton, R. Viswanathan, S. Ghaffarian, C. P. Hill, and W. I. Sundquist, 2005, Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins: *EMBO J*, v. 24, p. 3658-69.

- Segura, E., C. Nicco, B. Lombard, P. Véron, G. Raposo, F. Batteux, S. Amigorena, and C. Théry, 2005, ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming: *Blood*, v. 106, p. 216-23.
- Skogberg, G., J. Gudmundsdottir, S. van der Post, K. Sandström, S. Bruhn, M. Benson, L. Mincheva-Nilsson, V. Baranov, E. Telemo, and O. Ekwall, 2013, Characterization of human thymic exosomes: *PLoS One*, v. 8, p. e67554.
- Skokos, D., S. Le Panse, I. Villa, J. C. Rousselle, R. Peronet, A. Namane, B. David, and S. Mécheri, 2001, Nonspecific B and T cell-stimulatory activity mediated by mast cells is associated with exosomes: *Int Arch Allergy Immunol*, v. 124, p. 133-6.
- Sokol, J., J. Blanchette-Mackie, H. S. Kruth, N. K. Dwyer, L. M. Amende, J. D. Butler, E. Robinson, S. Patel, R. O. Brady, and M. E. Comly, 1988, Type C Niemann-Pick disease. Lysosomal accumulation and defective intracellular mobilization of low density lipoprotein cholesterol: *J Biol Chem*, v. 263, p. 3411-7.
- Stahelin, R. V., F. Long, K. Diraviyam, K. S. Bruzik, D. Murray, and W. Cho, 2002, Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs: *J Biol Chem*, v. 277, p. 26379-88.
- Stenmark, H., 2009, Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 10, p. 513-25.
- Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Göttinger, 2003, AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding: *Cell*, v. 114, p. 689-99.
- Stuffers, S., C. Sem Wegner, H. Stenmark, and A. Brech, 2009, Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs: *Traffic*, v. 10, p. 925-37.
- Subra, C., K. Laulagnier, B. Perret, and M. Record, 2007, Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies: *Biochimie*, v. 89, p. 205-12.
- Sundquist, W. I., and H. G. Kräusslich, 2012, HIV-1 assembly, budding, and maturation: *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 2, p. a006924.
- Tamai, K., N. Tanaka, T. Nakano, E. Kakazu, Y. Kondo, J. Inoue, M. Shiina, K. Fukushima, T. Hoshino, K. Sano, Y. Ueno, T. Shimosegawa, and K. Sugamura, 2010, Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 399, p. 384-90.

- Teis, D., S. Saksena, B. L. Judson, and S. D. Emr, 2010, ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation: *EMBO J*, v. 29, p. 871-83.
- Teo, H., O. Perisic, B. González, and R. L. Williams, 2004, ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes: *Dev Cell*, v. 7, p. 559-69.
- Théry, C., M. Boussac, P. Véron, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, J. Garin, and S. Amigorena, 2001, Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles: *J Immunol*, v. 166, p. 7309-18.
- Théry, C., M. Ostrowski, and E. Segura, 2009, Membrane vesicles as conveyors of immune responses: *Nat Rev Immunol*, v. 9, p. 581-93.
- Théry, C., A. Regnault, J. Garin, J. Wolfers, L. Zitvogel, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena, 1999, Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73: *J Cell Biol*, v. 147, p. 599-610.
- Toda, Y., K. Takata, Y. Nakagawa, H. Kawakami, S. Fujioka, K. Kobayashi, Y. Hattori, Y. Kitamura, K. Akaji, and E. Ashihara, 2015, Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 456, p. 768-73.
- Tonnetti, L., M. C. Verí, E. Bonvini, and L. D'Adamio, 1999, A role for neutral sphingomyelinase-mediated ceramide production in T cell receptor-induced apoptosis and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction: *J Exp Med*, v. 189, p. 1581-9.
- Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brügger, and M. Simons, 2008, Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes: *Science*, v. 319, p. 1244-7.
- Valadi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, 2007, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells: *Nat Cell Biol*, v. 9, p. 654-9.
- Vallabhaneni, K. C., P. Penfornis, S. Dhule, F. Guillonneau, K. V. Adams, Y. Y. Mo, R. Xu, Y. Liu, K. Watabe, M. C. Vemuri, and R. Pochampally, 2015, Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal

- stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites: *Oncotarget*, v. 6, p. 4953-67.
- van Balkom, B. W., A. S. Eisele, D. M. Pegtel, S. Bervoets, and M. C. Verhaar, 2015, Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting: *J Extracell Vesicles*, v. 4, p. 26760.
- van Deurs, B., P. K. Holm, L. Kayser, K. Sandvig, and S. H. Hansen, 1993, Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes: *Eur J Cell Biol*, v. 61, p. 208-24.
- van Niel, G., S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M. S. Marks, E. Rubinstein, and G. Raposo, 2011, The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis: *Dev Cell*, v. 21, p. 708-21.
- Van Niel, G., J. Mallegol, C. Bevilacqua, C. Candalh, S. Brugière, E. Tomaskovic-Crook, J. K. Heath, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman, 2003, Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice: *Gut*, v. 52, p. 1690-7.
- van Niel, G., G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman, 2001, Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles: *Gastroenterology*, v. 121, p. 337-49.
- VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis, and C. A. Carter, 2001, Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag): *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, p. 7724-9.
- Votteler, J., and W. I. Sundquist, 2013, Virus budding and the ESCRT pathway: *Cell Host Microbe*, v. 14, p. 232-41.
- Wang, G., M. Dinkins, Q. He, G. Zhu, C. Poirier, A. Campbell, M. Mayer-Proschel, and E. Bieberich, 2012, Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and prostate apoptosis response 4 (PAR-4): potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer disease (AD): *J Biol Chem*, v. 287, p. 21384-95.
- White, I. J., L. M. Bailey, M. R. Aghakhani, S. E. Moss, and C. E. Futter, 2006, EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation: *EMBO J*, v. 25, p. 1-12.
- Wollert, T., C. Wunder, J. Lippincott-Schwartz, and J. H. Hurley, 2009, Membrane scission by the ESCRT-III complex: *Nature*, v. 458, p. 172-7.
- Wubbolts, R., R. S. Leckie, P. T. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Möbius, J. Hoernschemeyer, J. W. Slot, H. J. Geuze, and W. Stoorvogel, 2003,

- Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation: *J Biol Chem*, v. 278, p. 10963-72.
- Wurdinger, T., N. N. Gatson, L. Balaj, B. Kaur, X. O. Breakefield, and D. M. Pegtel, 2012, Extracellular vesicles and their convergence with viral pathways: *Adv Virol*, v. 2012, p. 767694.
- Yabu, T., S. Imamura, M. Yamashita, and T. Okazaki, 2008, Identification of Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat stress-induced ceramide generation and apoptosis: *J Biol Chem*, v. 283, p. 29971-82.
- Zimmermann, P., D. Tomatis, M. Rosas, J. Grootjans, I. Leenaerts, G. Degeest, G. Reekmans, C. Coomans, and G. David, 2001, Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments: *Mol Biol Cell*, v. 12, p. 339-50.

SCH