

Role of Rab11 in *Leishmania* trafficking in macrophages

RITUPARNA BASAK

ABSTRACT

Leishmania donovani (Ld), the causative agent of visceral leishmaniasis, is an intracellular protozoan parasite which is dependent on its host cells for acquisition of various essential nutrients such as heme, purine, amino acids, fatty acids and vitamins. *L. donovani* express a specific receptor for hemoglobin uptake but how it salvages iron from the host cells is not well studied. Here, we report that *Leishmania* specifically upregulate the expression of host Rab11a and subsequently recruit it on the LAMP1+ parasitophorous vacuoles (PVs). The recruitment of Rab11a on Ld-PV is a live parasite-driven phenomenon as dead parasites are unable to recruit host Rab11a.

We have also addressed the mechanism of regulation of Rab11a expression in *Leishmania* infected macrophages. We have identified miR-181c to have a specific target site on the 3'UTR of Rab11a mRNA and overexpression of the miR-181c in macrophages results in reduced level of host Rab11a. Our results have shown that *Leishmania* infection significantly inhibits the expression of miR-181c in macrophages by degrading C/EBP- β . Thus, *Leishmania* inhibits the synthesis of miR-181c by degrading C/EBP- β and thereby enhances level of Rab11a in infected macrophages.

Leishmania infection enhances the transferrin uptake in the infected cells compared to uninfected cells and this enhanced uptake is Rab11a dependent as overexpression of miR-181c blocks the uptake of transferrin by infected cells. Interestingly, amastigotes isolated from macrophages contain significantly higher transferrin. The enhanced transferrin uptake is due to higher expression of transferrin receptor (TfR) in infected cells. Moreover, Ld-PVs also recruit and retain the transferrin receptor and thereby block the recycling of TfR to the cell surface in *Leishmania* infected macrophages. The recruitment of both Rab11a and TfR on Ld-PVs is blocked by overexpression of miR-181c indicating that their recruitment is Rab11a dependent process. Finally, we have found that intracellular growth of parasite is severely compromised in miR-181c overexpressed THP-1 cells and the inhibition of parasite growth is significantly reversed by the addition of hemin. These results demonstrate that *Leishmania* infection upregulates host Rab11a expression via downregulation of miR-181c to acquire iron from transferrin for their survival.

सार

लीशमैनिया डोनोवानी (एलडी), आंत लीशमैनियासिस का प्रेरक एजेंट, एक इंटरसेल्युलर प्रोटोजोआ परजीवी है जो हीम, प्यूरीन, अमीनो एसिड, फैटी एसिड और विटामिन जैसे विभिन्न आवश्यक पोषक तत्वों के अधिग्रहण के लिए अपने मेजबान कोशिकाओं पर निर्भर है। एल डोनोवानी हीमोग्लोबिन ग्रहण के लिए एक विशिष्ट रिसेप्टर व्यक्त करते हैं लेकिन यह मेजबान कोशिकाओं से आयरन को कैसे बचाता है इसका अच्छी तरह से अध्ययन नहीं किया गया है। यहां, हम रिपोर्ट करते हैं कि लीशमैनिया विशेष रूप से मेजबान Rab11a की अभिव्यक्ति को बढ़ाता है और बाद में इसे LAMP1+ पैरासिटोफोरस रिक्तिका (PVs) पर भर्ती करता है। Ld-PV पर Rab11a की भर्ती एक जीवित परजीवी-प्रेरित घटना है क्योंकि मृत परजीवी मेजबान Rab11a को भर्ती करने में असमर्थ हैं।

हमने लीशमैनिया संक्रमित मैक्रोफेज में Rab11a अभिव्यक्ति के नियमन के तंत्र पर भी चर्चा की है। हमने Rab11a mRNA के 3'UTR पर एक विशिष्ट लक्ष्य साइट के लिए miR-181c की पहचान की है और मैक्रोफेज में miR-181c की अधिक अभिव्यक्ति के परिणामस्वरूप होस्ट Rab11a का स्तर कम हो जाता है। हमारे परिणामों से पता चला है कि लीशमैनिया संक्रमण C/EBP- β को खराब करके मैक्रोफेज में miR-181c की अभिव्यक्ति को महत्वपूर्ण रूप से रोकता है। इस प्रकार, लीशमैनिया C/EBP- β को निम्नीकृत करके miR-181c के संश्लेषण को रोकता है और इस प्रकार संक्रमित मैक्रोफेज में Rab11a के स्तर को बढ़ाता है।

लीशमैनिया संक्रमण असंक्रमित कोशिकाओं की तुलना में संक्रमित कोशिकाओं में ट्रांसफ़रिन ग्रहण को बढ़ाता है और यह बढ़ा हुआ ग्रहण Rab11a पर निर्भर है क्योंकि miR-181c की अधिक अभिव्यक्ति संक्रमित कोशिकाओं द्वारा ट्रांसफ़रिन के ग्रहण को अवरुद्ध करती है। दिलचस्प बात यह है कि मैक्रोफेज से अलग किए गए एमास्टिगोट्स में काफी अधिक ट्रांसफ़रिन होता है। ट्रांसफ़रिन ग्रहण में वृद्धि संक्रमित कोशिकाओं में ट्रांसफ़रिन रिसेप्टर (टीएफआर) की उच्च अभिव्यक्ति के कारण होती है। इसके अलावा, एलडी-पीवी ट्रांसफ़रिन रिसेप्टर को भी भर्ती करते हैं और बनाए रखते हैं और इस तरह लीशमैनिया संक्रमित मैक्रोफेज में कोशिका की सतह पर टीएफआर के पुनर्चक्रण को रोकते हैं। Ld-PVs पर Rab11a और TfR दोनों की भर्ती miR-181c के ओवरएक्सप्रेशन द्वारा अवरुद्ध है, जो दर्शाता है कि उनकी भर्ती Rab11a पर निर्भर प्रक्रिया है। अंत में, हमने पाया है कि miR-181c ओवरएक्सप्रैस्ड THP-1 कोशिकाओं में परजीवी की इंटरसेल्युलर वृद्धि गंभीर रूप से प्रभावित होती है और हेमिन के जुड़ने से परजीवी वृद्धि का अवरोध काफी हद तक उलट जाता है। इन परिणामों से पता चलता है कि लीशमैनिया संक्रमण अपने अस्तित्व के लिए ट्रांसफ़रिन से आयरन प्राप्त करने के लिए miR-181c के डाउनरेगुलेशन के माध्यम से मेजबान Rab11a अभिव्यक्ति को अपग्रेड करता है।