

Functional Characterization of HOPS Complex in *Leishmania*

Vikas Dhar Dubey

Abstract

Previously, we have shown that *Leishmania* endocytosed hemoglobin (Hb) by specific receptor (HbR) and traffic to lysosome via early endosomes in Rab5 and Rab7 dependent process. However, the mechanism of transition of endosomes to lysosomes is unknown. Therefore, we have characterized the role of HOPS complex in this process. Here, we have cloned and expressed all components of HOPS complex (LdVps11, LdVps16, LdVps18, LdVps33, LdVps39 and LdVps41) homologue from *Leishmania* to understand their role in endocytosis in *Leishmania*. We have found that RFP-LdVps41 co-localize with GFP-LdVps11, GFP-LdVps16, GFP-LdVps18, GFP-LdVps33 and GFP-LdVps39 in Ld-Rab7 positive and LysoTracker labelled late endosome and lysosome compartments in *Leishmania*. Using *in-vitro* protein interaction, we have found that the LdVps41 specifically interacts with LdVps11, LdVps16, LdVps18, LdVps33 and LdVps39. LdVps11 specifically binds with LdVps16, LdVps18 and LdVps39 but not with LdVps33 while LdVps16 specifically interacts with LdVps18 and LdVps33 but not with LdVps39. Thus, LdVps41 is found to be the central molecule in HOPS complex interacting with various subunits to form HOPS complex in *Leishmania*. Interestingly, we have found that LdVps41 interacts with all other HOPS complex proteins via its C-terminal domain (CTD-LdVps41⁹⁰¹⁻¹⁴⁴⁶). In contrast, we have found that N-terminal domain of LdVps41 (NTD-LdVps41¹⁻⁵⁰⁰) specifically binds with GTP form of LRab7 and LdHbR. These results suggest that LdVps41 possibly acts as tethering molecule between LdHbR and LdRab7 to mediate the transport of Hb from endosomes to the lysosomes in *Leishmania*. We have overexpressed LdVps41 truncated proteins in *Leishmania* to determine their role in the Hb trafficking in the parasite. We have found that transgenic parasites overexpressing GFP-NTD-LdVps41¹⁻⁵⁰⁰ inhibit the transport of Hb to the lysosomes as it does not interact with other components of HOPS complex. Similarly, trafficking of Hb to the lysosomal compartment is also blocked in GFP-CTD-LdVps41⁹⁰¹⁻¹⁴⁴⁶ overexpressed transgenic parasites as this mutant fails to recruit LdRab7 and LdHbR. As Hb is essential for the survival of parasites within macrophages, we have found that transgenic parasites overexpressing GFP-NTD-LdVps41¹⁻⁵⁰⁰ or GFP-CTD-LdVps41⁹⁰¹⁻¹⁴⁴⁶ show growth defect in macrophages as parasites fail to acquire heme from lysosomal degradation of Hb. In the present investigation, we have identified and functionally characterized the role HOPS complex in Hb trafficking to lysosomes and have found that HOPS complex function is necessary for the survival of the parasites.

सारांश

इससे पहले, हमने दिखाया है कि विशिष्ट रिसेप्टर (एच. बी. आर.) द्वारा लीशमैनिया एंडोसाइटोसिड हीमोग्लोबिन (एच. बी.) को एलडी-रैब5 और एलडी-रैब7 आश्रित प्रक्रिया में प्रारंभिक एंडोसोम के माध्यम से लाइसोसोम तक स्थानांतरित करता है। हालाँकि, एंडोसोम से लाइसोसोम में स्थानान्तरण की क्रियाविधि अज्ञात है। इसलिए हमने इस प्रक्रिया में हॉप्स कॉम्प्लेक्स की भूमिका का वर्णन किया है। यहां हमने लिशमैनिया में एंडोसाइटोसिस प्रक्रिया में भूमिका निर्वहन करने वाले सभी घटकों की भूमिका को समझने के लिए लिशमैनिया से हॉप्स कॉम्प्लेक्स (एलडीवीपीएस11, एलडीवीपीएस16, एलडीवीपीएस18, एलडीवीपीएस33, एलडीवीपीएस39, एलडीवीपीएस41) के सजातीय सभी घटकों को क्लोन और व्यक्त किया है। हमने पाया है कि आरएफपी-एलडीवीपीएस41 जीएफपी-एलडीवीपीएस11, जीएफपी-एलडीवीपीएस16, जीएफपी-एलडीवीपीएस18, जीएफपी-एलडीवीपीएस33 और जीएफपी-एलडीवीपीएस39 के साथ एलडी-रैब7 पॉजिटिव और लाइसोट्रैकर चिह्नित लेट एंडोसोम और लाइसोसोम कक्षों में लीशमैनिया में सह-स्थानीयकृत है। इन-विट्रो प्रोटीन इंटरैक्शन का उपयोग करते हुए, हमने पाया है कि एलडीवीपीएस41 विशेष रूप से एलडीवीपीएस11, एलडीवीपीएस16, एलडीवीपीएस18, एलडीवीपीएस33 और एलडीवीपीएस39 के साथ अंतःक्रिया करता है। एलडीवीपीएस11 विशेष रूप से एलडीवीपीएस16, एलडीवीपीएस18 और एलडीवीपीएस39 के साथ जुड़ता है, लेकिन एलडीवीपीएस33 के साथ नहीं, जबकि एलडीवीपीएस16 विशेष रूप से एलडीवीपीएस18 और एलडीवीपीएस33 के साथ अंतःक्रिया करता है, लेकिन एलडीवीपीएस39 के साथ नहीं। इस कारणवश, एलडीवीपीएस41 को हॉप्स कॉम्प्लेक्स का केंद्रीय अणु पाया गया है। जो विभिन्न उपइकाइयों के साथ अंतःक्रिया करके लिशमैनिया में हॉप्स कॉम्प्लेक्स का निर्माण करता है। हमने अपनी शोध में यह रोचक निष्कर्ष भी प्राप्त किया कि एलडीवीपीएस41 अपने C-टर्मिनल डोमेन (सीटीडी-एलडीवीपीएस41⁹⁰¹⁻¹⁴⁴⁶) के माध्यम से अन्य सभी HOPS कॉम्प्लेक्स प्रोटीन के साथ अंतःक्रिया करता है। इसके विपरीत, हमने पाया है कि एलडीवीपीएस41 (एनटीडी-एलडीवीपीएस41¹⁻⁵⁰⁰) का एन-टर्मिनलडोमेन विशेष रूप से एलडीएचबीआर और एलडी-रैब7 के GTP फॉर्म से जुड़ता है। प्रेक्षित परिणाम यह प्रस्तावित करते हैं कि एलडीवीपीएस41 संभवतः लिशमैनिया में एंडोसोम से लाइसोसोम तक Hb के स्थानांतरण में मध्यस्थता करने के लिए एलडीएचबीआर और एलडी-रैब7 के बीच बंधन अणु के रूप में कार्य करता है। हमने लिशमैनिया में एलडीवीपीएस41 खंडित किए गए प्रोटीन को ओवरएक्सप्रेस किया जिससे लिशमैनिया में एचबी की ट्रांस्फेरिंग में उनकी भूमिका का निर्धारण हो सके। तदनुसार यह भी पाया गया है कि जीएफपी-एनटीडी-एलडीवीपीएस41¹⁻⁵⁰⁰ को ओवरएक्सप्रेस करने वाले ट्रांसजेनिक लिशमैनिया लाइसोसोम में Hb के परिवहन को रोकते हैं क्योंकि वे HOPS कॉम्प्लेक्स के अन्य घटकों के साथ अंतःक्रिया नहीं करते हैं। तदनुसार, जीएफपी-सीटीडी-एलडीवीपीएस41⁹⁰¹⁻¹⁴⁴⁶ ओवरएक्सप्रेस्ड ट्रांसजेनिक

लीशमैनिया में भी लाइसोसोमल कक्ष में एचबी की ट्रैफ़िकिंग अवरुद्ध है क्योंकि यह उत्परिवर्ती एलडीएचबीआर और एलडी-रैब7 को रिक्रूट करने में विफल है। चूंकि एचबी मैक्रोफेज के भीतर लीशमैनिया के उत्तरजीविता के लिए आवश्यक है, हमें यह ज्ञात हुआ है कि जीएफपी-एनटीडी-एलडीवीपीएस4¹⁻⁵⁰⁰ अथवा जीएफपी-सीटीडी-एलडीवीपीएस4^{1⁹⁰¹⁻¹⁴⁴⁶} को अधिक व्यक्त करते हुए ट्रांसजेनिक लीशमैनिया मैक्रोफेज में संख्या में वृद्धि दोष दिखाते हैं, क्योंकि लीशमैनिया एचबी के लाइसोसोमल खंडन से हीम प्राप्त करने में विफल रहते हैं। वर्तमान अध्ययन में हमने लाइसोसोम में एचबी ट्रैफ़िकिंग में हॉप्स कॉम्प्लेक्स की भूमिका की पहचान की है और कार्यात्मक रूप से इसकी विशेषता बताई है तथा पाया है कि हॉप्स कॉम्प्लेक्स प्रक्रिया लीशमैनिया के अतिजीवन के लिए आवश्यक है।