



HAL
open science

Structure et fonction d'un ligand d'ESCRT-III, LgD/CC2D1A

Nicolas Martinelli

► **To cite this version:**

Nicolas Martinelli. Structure et fonction d'un ligand d'ESCRT-III, LgD/CC2D1A. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENV078 . tel-00769410

HAL Id: tel-00769410

<https://theses.hal.science/tel-00769410>

Submitted on 1 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Structurale et Nanobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Nicolas Martinelli

Thèse dirigée par le **Pr Winfried Weissenhorn**

préparée au sein de l'**Unité d'Interaction Virus – Cellule Hôte**
dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

Structure et fonction d'un ligand d'ESCRT-III, LgD/CC2D1A.

Thèse soutenue publiquement le **13 Décembre 2011**,
devant le jury composé de :

Dr Carlo PETOSA

Institut de Biologie Structurale (Président et Examineur)

Dr Stéphane BRESSANELLI

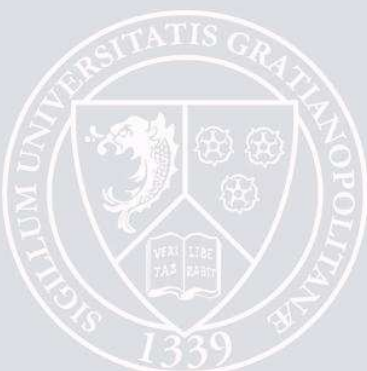
Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale (Rapporteur)

Dr Denis GERLIER

Laboratoire de Virologie Humaine (Rapporteur)

Pr Winfried WEISSENHORN

Unité d'Interaction Virus – Cellule Hôte (Examineur)



"The trouble with having an open mind, of course,
is that people will insist on coming along and trying to put things in it."

Terry Pratchett

"Many men go fishing all their lives not knowing it is not fish they are after."

Henry David Thoreau

A mes grands parents.

Un petit mot en passant.

Je veux tout d'abord remercier les docteurs **Carlo Petosa, Stéphane Bressanelli** et **Denis Gerlier** pour leurs remarques constructives, ainsi que l'honneur qu'ils m'ont fait d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie également le Professeur **Winfried Weissenhorn**, mon directeur de thèse, qui a eu la gentillesse de m'accueillir en stage d'été dès mon retour d'Angleterre, et qui m'a ensuite accompagné du Master 2 jusqu'à cette soutenance.

Merci aux équipes du Dr **Patricia Bassereau** (Institut Curie) et du Pr **Rémy Sadoul** (GIN) pour les collaborations réalisées, ou en cours, sur la protéine CHMP2B.

Un grand merci encore à tous les membres de l'équipe, que j'ai eu la chance de côtoyer pendant près de quatre ans. Merci donc aux « anciens », **Andreas, Anja, Bridgette, Charles, Ganesh, Julianna, Miriam, Ricardo, Suman** et **Victor**, pour tous les moments passés, sérieux ou moins sérieux! Un remerciement particulier à **Bettina** qui m'a aidé à mon arrivée au laboratoire, et qui m'a formé à l'art très délicat de la purification de protéines, et des protéines CHMP en particulier.

Je remercie également les "nouveaux"! **Aurélien, Emilie** et **Nick**, qui ont partagé avec moi l'expérience de la thèse, **David** et sa Dutch attitude, mais aussi **Jens, Pauline, Patricia** et **Nolwenn**, pour avoir permis de garder cette si bonne ambiance au laboratoire. Comme je le disais après ma soutenance, on ne se fait pas ici que des collègues mais également des amis !

Merci aussi à la « lunch team », **Ivan, Céleste, Eric, Filip, Leandro, Martínez, Audrey Conti**, et tant d'autres ! Merci à **Charlotte, Habib, Ambroise, Cédric, Lucy, Alex, Thibaut, Louiza, les deux Julien, Pierre-Alain, Delphine, Denis**, ainsi qu'à tous les potes de la promo.

Je n'oublie pas tous les buts ratés ou marqués, les tacles rageurs et l'engagement du « PSB Football Club », qui s'est bien développé en trois ans sur les pelouses et les terrains synthétiques.

J'exprime toute ma reconnaissance à **Pierre Métais, Jocelyne Visconti, Marie-Laure Guérant, Sandrine Vignon** et **Elena Colas**, si importants au bon fonctionnement de l'institut.

Je veux, encore une fois, remercier **ma famille**, en particulier **mes parents**, pour leur soutien sans faille pendant ces longues années, pour les expériences qui durent, les horaires difficiles et les week-ends chargés. J'ai également une pensée pour mes grands parents, en particulier Martin qui nous a quittés à la fin de la première année.

Evidemment, je ne peux pas terminer ces remerciements sans parler d'**Audrey**, dont la persévérance et l'abnégation sont un modèle pour moi depuis maintenant trois ans. Merci donc à toi, pour ton soutien, ta gentillesse, ton goût des mammifères plantigrades, et en particulier les ursidés.

Abréviations.....1

CHAPITRE I – Introduction

I - Introduction sur la voie endo-lysosomale.....	7
1. Historique sur la voie endo-lysosomale.....	7
2. Généralités sur l'internalisation des récepteurs.....	8
2.1 Les voies de recyclage.....	9
2.2 Les voies de dégradation.....	9
3. La matrice endosomale.....	10
II - La machinerie ESCRT.....	12
4. Présentation générale d'ESCRT.....	12
4.1 Découverte des ESCRTs.....	12
4.2 Formation des ILVs : un mécanisme ordonné.....	13
4.3 Le recrutement du cargo : rôle d'ESCRT-0.....	16
5. Organisation d'ESCRT-I et ESCRT-II.....	19
5.1 Structure d'ESCRT-I.....	19
5.2 Structure d'ESCRT-II.....	20
5.3 Rôle d'ESCRT-I et ESCRT-II dans l'initiation du bourgeonnement.....	22
6. Rôles et structure d'ESCRT-III.....	23
6.1 Structure générale des protéines CHMPs.....	24
6.2 Le principe de l'autoinhibition.....	26
6.3 Les différents polymères ESCRT.....	26
6.4 Polymérisation, Constriction puis Scission.....	29
6.5 Des modèles détaillés, mais contradictoires, d'ESCRT-III.....	31
7. Le complexe Vps4-VTA1.....	33
7.1 Structure de Vps4-VTA1.....	33
7.2. Les protéines associées à Vps4 : rôle de VTA1 et IST1.....	35
7.3 Une carte d'interactions complexe.....	35
8. Les fonctions émergentes d'ESCRT.....	35
8.1 Le bourgeonnement des virus enveloppés.....	35
8.1.1 Généralités sur le cycle viral.....	35
8.1.2 Les bourgeonnements ESCRT-dépendants (cas du virus du VIH).....	39
8.1.3 Les domaines tardifs.....	39
8.2 La cytokinèse.....	41
8.2.1 Généralités sur la cytokinèse.....	41
8.2.2 Une fonction conservée chez les archaebactéries.....	41
III - CC2D1, un nouveau partenaire de CHMP4B.....	44
9. Caractérisation d'un nouveau mutant chez Drosophila Melanogaster.....	44
10. Rôle de la voie endosomale dans la signalisation du récepteur Notch.....	44
10.1 Implication de Lethal Giant Discs dans la régulation de Notch.....	45
10.2 Des arguments en faveur d'un lien direct entre LgD et ESCRT.....	46

11. LgD appartient à une nouvelle famille de protéines non caractérisée.....	47
11.1 Une famille conservée chez les eucaryotes.....	47
11.2 Les autres rôles de la famille CC2D.....	47
11.2.1 Freud-1/CC2D1A dans le retard mental non syndromique.....	47
11.2.2 CC2D1A dans la régulation de l'immunité innée.....	48
11.2.3 Aki1/CC2D1A dans la cohésion du centrosome.....	49
IV – Objectifs du travail de thèse.....	50

CHAPITRE II - Matériel & Méthodes.....51

I – Biologie moléculaire.....	51
1.1 Tableau des constructions réalisées et/ou testées pour cette étude.....	51
1.2 Les vecteurs d'expression.....	53
II - Interactions CC2D1A – CHMP4B.....	53
2.1 Purification du fragment CC2D1A ₃₄₆₋₄₅₅	53
2.2 Formation du complexe CC2D1A / CHMP4B par pulldown.....	53
2.3 Formation du complexe CC2D1A / CHMP4B par méthode batch.....	53
2.4 Expériences de co-sédimentation CC2D1A / CHMP4B.....	54
2.5 Mesures d'interactions par SPR.....	54
III - Purification et Caractérisation de LgD.....	54
3.1 Purification de Lethal Giant Discs chez E.Coli.....	54
3.2 Préparation des liposomes.....	55
3.3 Tests de flottation.....	55
3.4 Cristallogénèse – cas des cristaux obtenus à partir du fragment LgD ₅₅₀₋₈₁₆	55
3.5 Résolution de la structure du fragment LgD 550-816 et construction du modèle.....	56
3.6 Traitement des données SAXS des fragments LgD.....	57
3.7 Modélisation Ab Initio des fragments LgD.....	57
3.8 Dichroïsme Circulaire.....	57
3.9 Thermoshift Assay.....	58
3.10 Ultracentrifugation Analytique.....	58
3.11 Test-expression et purification de CC2D1B-FLAG en cellules de mammifères.....	58
3.12 Isothermal Titration Calorimetry.....	58
IV - Caractérisation de la protéine CHMP2B.....	59
4.1 Préparation des liposomes (CHMP2B).....	59
4.2 Tests de flottation.....	59
4.3 Purification de MBP-CHMP2B recombinante chez E.Coli.....	59
4.4 Purification de CHMP2B 6xHis et CHMP2B Δ C recombinante chez E.Coli.....	59
4.5 Détermination de la concentration de CHMP2B 6xhis et variants.....	60
4.6 Marquage de CHMP2B par Alexa-Fluo 488.....	60
4.7 Purification de MBP CHMP4B Δ C-Alix recombinante chez E.Coli.....	61
4.8 Mesures d'interactions par SPR.....	61

CHAPITRE III – CC2D1A est un nouveau régulateur de polymérisation de CHMP4B.

Article 1 : CC2D1A is a new regulator of ESCRT-III CHMP4B polymer formation.....62

1. Introduction.....	86
2. Analyse de la structure cristallographique de CHMP4B 23-97.....	87
2.1 Les extrémités du fragment définissent une interface de dimérisation.....	87
2.2 La forme cristallisée présente une hélice $\alpha 2$ incomplète.....	89
3. Mise en évidence de mutants CHMP4B ne liant plus CC2D1A.....	91
4. Mise en évidence d'un mutant CC2D1A ne liant plus CHMP4B.....	93
5. Implication de CC2D1A dans la polymérisation de CHMP4B.....	96
6. Lien avec le bourgeonnement du VIH.....	96
7. Discussion.....	99
7.1 Caractérisation du fragment CC2D1A ₃₄₆₋₄₅₅	99
7.2 Rôle de CC2D1A au niveau de l'endosome.....	100
7.3 Lien entre CC2D1A et polymérisation de CHMP4B.....	101
7.4 Modèle d'activation de CHMP4B en deux temps.....	104

CHAPITRE IV – Structure d'un fragment de Lethal Giant Discs

1. Introduction.....	106
2. Résolution de la structure du fragment LgD ₅₅₀₋₈₁₆	107
3. Présentation générale de la structure.....	110
4. Le domaine C2 de LgD pourrait stabiliser LgD à la membrane de l'endosome.....	111
4.1 Le domaine C2 de LgD présente sur sa face concave un site polybasique.....	111
4.2 Les boucles supérieures décrivent un second motif d'interaction.....	113
4.3 Le fragment LgD ₅₅₀₋₈₁₆ n'interagit pas in vitro avec des liposomes.....	115
5. Caractérisation et cristallisation de fragments étendus de LgD.....	117
5.1 Purification et cristallisation de LgD ₅₇₅₋₈₁₆	120
5.2 Purification et cristallisation de LgD ₄₉₁₋₈₁₆	120
5.3 Purification du fragment LgD ₃₅₈₋₈₁₆ et optimisation du protocole.....	122
6. Un modèle partiel de LgD en solution.....	127
6.1 Modèle SAXS du fragment cristallisé LgD ₅₇₅₋₈₁₆	127
6.2 Modèle SAXS des fragment LgD ₄₉₁₋₈₁₆ et LgD ₃₅₈₋₈₁₆	130
7. Discussion.....	134
7.1 Description générale du fragment LgD et contexte de l'étude.....	134
7.2 Interaction du domaine C2 avec la membrane de l'endosome.....	135
7.3 Homologies avec d'autres domaines C2 connus.....	136
7.4 Modèles SAXS de LgD.....	137
7.5 Perspectives.....	137

CHAPITRE V – Caractérisation de la protéine CHMP2B in vitro

Article 2 : Charged Multivesicular Body Protein-2B (CHMP2B) of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane.....139

1. Contexte de l'étude.....	162
2. Purification et caractérisation de la construction MBP – CHMP2B.....	162
3. Purification et caractérisation des constructions CHMP2B – 6xHis.....	164
4. Interaction de CHMP2B avec des membranes in vitro.....	167
5. Détermination de l'interaction CHMP4B-CHMP2B par SPR.....	170
6. Purification et Caractérisation de la protéine CHMP4B-6xHis.....	173
7. Orientation future du projet : le système GUV (collaboration P. Bassereau).....	176
8. Discussion.....	178
8.1 Un modèle simplifié de polymérisation de CHMP2B.....	178
8.2 Interaction de CHMP2B avec la membrane.....	179
8.3 Recrutement de CHMP2B par CHMP4B.....	180
8.4 Ordre d'assemblage des ESCRTs.....	181

ANNEXES.....182

Revue : Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission.....183

BIBLIOGRAPHIE.....195

RESUME / ABSTRACT215

Abréviations

Aki1 : Akt-Kinase Interacting protein 1

ALIX / AIP1: ALg2 Interacting protein X

C2 : Conserved 2 domain

CC2D1 : Coiled-coil C2 Domain containing protein

CHMP : Charged Multivesicular Body Protein

COS-7 : CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material. 7

DUIM : Double Ubiquitin Interacting Motif

DID2 : Doa4-Independent Degradation 2

DLS : Dynamic Light Scattering

DM14 : Drosophila Melanogaster 14

EE : Early Endosome

EGF : Epidermal Growth Factor

ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

FTD : Fronto Temporal Dementia

GUV : Giant Unilamellar Vesicle

HBS : HEPES-Buffered Saline

HEK293 : Human Embryonic Kidney cell line 293

HIV : Human Immunodeficiency Virus

IST1 : Increased Sodium Tolerance 1

FREUD-1 : FRE- binding protein, five' repressor element Under Dual repression binding protein-1

LgD : Lethal Giant Discs

MALLS : Multi-Angle Laser Light Scattering

MBP : Maltose Binding Protein

MIM : **MIT** domain **I**nteracting **M**otif

MIT : **M**icrotubule **I**nteracting and **T**rafficking domain

NEDD4 : **NE**uronal precursor **D**evelopment **D**ownregulated protein **4**

Ni-NTA : **N**ickel – **N**itrilo **T**riacetic **A**cid

NSD : **N**ormalized **S**patial **D**iscrepancy

PDK1 : **P**yruvate **D**ehydrogenase **K**inase isozyme **1**

PH : **P**leckstrin **H**omology

PI3P / PtdIns3P : **P**hosphatidyl **I**nositol **3**-**P**hosphate

PKC : **P**roteine **K**inase **C**

SAXS : **S**mall-**A**ngle **X**-ray diffraction **S**cattering

SDS-PAGE : **S**odium **D**odecyl **S**ulfate **P**oly**A**crylamide **G**el **E**lectrophoresis

SPR : **S**urface **P**lasmon **R**esonance

Snf7 : **S**ucrose **N**on-**F**ermenting **7**

TAPE : **TBK1**-**A**ssociated **P**rotein in **E**ndolysosomes

TEV : **T**obacco **E**tch **V**irus

TSG101 : **T**umor **S**usceptibility **G**ene **101**

TTC19 : **T**etra**T**ri**C**opeptide repeat domain **19**

IPTG : **I**so**P**ropyl β -**D**-1-**T**hio**G**alactopyranoside

ITC : **I**sothermal **T**itration **C**alorimetry

UEV : **U**biquitin **E2** **V**ariant

VIH : **V**irus de l'**I**mmuno-déficience **H**umaine

VLP : **V**irus **L**ike **P**article

VPS : **V**acuolar **P**rotein **S**orting

CHAPITRE I – Introduction

I - Introduction sur la voie endo-lysosomale

1. Historique sur la voie endo-lysosomale

Les compartiments composant la voie endo-lysosomale dessinent un système d'organelles complexe, connu depuis de nombreuses décennies mais dont l'étude sur le plan biochimique aura tardé à se dessiner. On leur attribue aujourd'hui trois fonctions majeures : le **recyclage** des récepteurs transmembranaires, la **dégradation** des macromolécules et la **signalisation**. Si cette troisième fonction (« la matrice endosomale », voir plus loin) commence seulement à émerger, les deux premières sont en revanche vieilles de plus de trente ans (Bainton DF, 1981).

Dès 1952, **Christian de Duve**, alors chercheur à l'université de Louvain en Belgique, s'est intéressé au rôle particulier de la glucose-6-phosphatase dans le cadre de travaux sur l'insuline (de Duve, 1966). A l'époque, l'enzyme était extrait du foie de rat en suivant des protocoles d'extraction rudimentaires, le matériel étant broyé et resuspendu avec de l'eau distillée dans un mixeur. Les progrès du fractionnement cellulaire permirent dans un second temps d'isoler la fraction microsomale contenant la protéine. Et parce que ces expériences de fractionnement nécessitaient quelques nouveaux contrôles, l'équipe belge opta pour un enzyme témoin : **l'acide phosphatase**. Curieusement, l'activité acide phosphatase détectée dans l'homogénat ne représentait, après cette étape de fractionnement, plus que 10% de la valeur attendue par rapport aux anciens protocoles de purification. Cinq jours plus tard, ayant laissé l'échantillon au réfrigérateur, les expérimentateurs mesurèrent une seconde fois cette activité : cette fois-ci, la valeur était redevenue comparable aux tous premiers essais. Christian de Duve et ses collaborateurs postulèrent donc que l'acide phosphatase, après l'étape de fractionnement, avait été **piégée dans un organelle encore non identifié**, mais différent des microsomes, et que l'enzyme devait au préalable diffuser hors de cet espace pour atteindre son substrat : rétrospectivement, **il s'agissait de la première mise en évidence du lysosome** en tant qu'organelle distinct des microsomes et des mitochondries. Depuis, à partir des années 60, le lysosome est passé du stade de « corps » à celui de système dynamique, associé à de nombreux processus physiologiques et pathologiques.



Christian de Duve

Fond. Francqui-Stichting

Par ailleurs **l'endocytose**, soit l'existence de mécanismes capables d'**internaliser** à la fois **la membrane plasmique** et les **récepteurs à sa surface**, n'est pas une idée neuve. Ces mécanismes ont été identifiés à partir des années 70, d'après les travaux de Steinman, Brown et Goldstein (Steinman et al., 1974 ; Steinman et al., 1976 ; Anderson et al., 1977 ; Goldstein et al., 1979). Steinman, d'abord, avait observé que les cellules de mammifères en culture (fibroblaste, macrophage) étaient capables d'internaliser d'énormes surfaces de membrane plasmique de façon constitutive. Cette capacité d'internalisation, bien supérieure à la surface des cellules elles-mêmes et à leur production propre de membrane, supposait l'existence de mécanismes alors inconnus pour recycler cette matière de l'intérieur vers l'extérieur.

De même, la capacité des cellules à communiquer entre elles et à adapter l'expression de certains marqueurs en réponse à une gamme de stimuli est un phénomène depuis longtemps caractérisé. Brown et

Goldstein, toujours dans les années 70, ont établi que **les récepteurs aux LDLs** étaient internalisés **au niveau des puits de clathrine**, puis recyclés. Ces éléments ont été étendus à toute une panoplie de récepteurs et de ligands. Depuis les années 80, une autre question fondamentale se pose quant à la capacité des endosomes à orienter spécifiquement certaines protéines vers les voies de recyclage et d'autres vers les voies de dégradation.

2. Généralités sur l'internalisation des récepteurs transmembranaires

L'endocytose des récepteurs, depuis la membrane plasmique, peut se faire selon deux modes distincts, mais qui ne seront pas abordés en détail dans le présent manuscrit : **l'endocytose dépendante des clathrines**, et **l'endocytose indépendante des clathrines (voir figure 1)**. Tous deux ont en commun de promouvoir l'internalisation des récepteurs transmembranaires dans des vésicules d'endocytose, cytoplasmiques et donc isolées du milieu extracellulaire. Si les deux mécanismes d'endocytose peuvent faire intervenir quelques protéines communes, ils restent néanmoins distincts dans leur mode d'action. Le signal qui va orienter un récepteur vers la voie endo-lysosomale est la **monoubiquitination**, par opposition aux récepteurs polyubiquitinés qui vont être eux orientés directement vers le protéasome. Cette monoubiquitination joue un rôle particulier dans **l'endocytose dépendante des clathrines**, où elle peut également intervenir comme adaptateur. Son rôle dans l'endocytose indépendante des clathrines est en revanche discuté. **La voie endo-lysosomale est composée de plusieurs compartiments différents**. On ne distinguera dans le présent chapitre que les compartiments ayant directement trait aux voies de recyclage et de dégradation associées aux récepteurs transmembranaires. Il est possible de distinguer chacun de ces compartiments selon deux aspects :

- **des critères morphologiques** (observations par microscopie électronique notamment)
- **des critères biochimiques** (mise en évidence de marqueurs spécifiques)

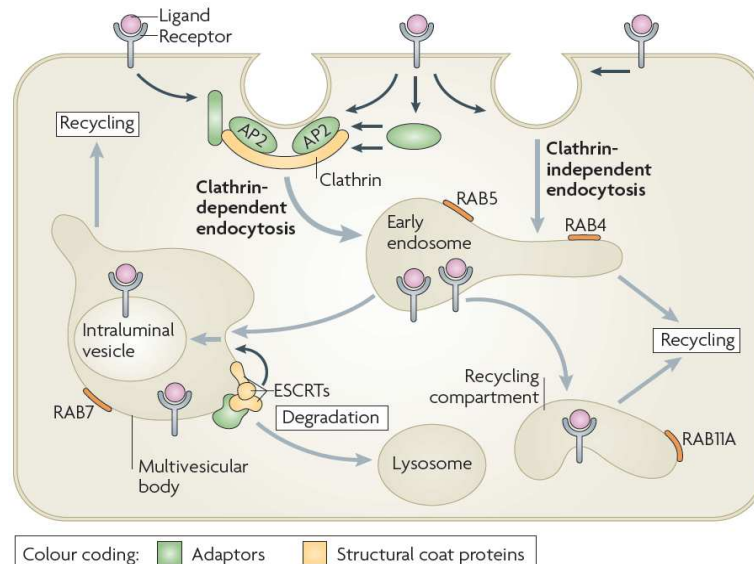


Figure 1: l'internalisation d'un récepteur depuis la membrane plasmique vers le lysosome fait intervenir plusieurs compartiments distincts.

Source: Alexander Sorkin and Mark von Zastrow (2009)

Quelque soit le mode d'endocytose, les vésicules formées vont en général fusionner avec l'endosome précoce (ou « Early Endosome »), encore appelé endosome de tri, et localisé à proximité de la membrane plasmique. Cet endosome précoce (EE) est une structure pléiomorphique, composée de domaines tubulaires et vacuolaires, mais dont l'identité est maintenue par la présence du marqueur Rab5 (Harald Stenmark, 2009). L'EE peut être considéré comme une **station de tri**, car il est **à l'interface des voies de recyclage et de dégradation**. A cet effet la protéine Rab5 est capable de recruter plusieurs composants de la machinerie de fusion telles que les protéines SNAREs. Cette GTPase aurait également la capacité de recruter spécifiquement plusieurs familles de PI-kinases (notamment la classe III de PI3K pour Rab5) afin de moduler localement la composition en PI. Cette fonction attribuerait donc un double rôle à cette GTPase en tant que plateforme.

2.1 Les voies de recyclage

Une partie de cet endosome précoce va se détacher et se différencier en **endosome de recyclage** (par l'intermédiaire de Rab4) ou encore en **compartiment de recyclage** (rôle de Rab11a). Un des modèles expliquant cette spécialisation progressive de l'endosome précoce est l'organisation de ces GTPases en microdomaines, diffusant latéralement à la surface de l'endosome pour coordonner le trafic intracellulaire dans l'espace et le temps (Harald Stenmark, 2009).

2.2 La voie de dégradation

Sous l'effet de la conversion de Rab5 en Rab7, l'EE va s'organiser localement en bourgeons, qui vont eux-mêmes s'individualiser et murer progressivement en **corps multivésiculaires**, puis en **endosomes tardifs**, et enfin en **lysosome**. Plus généralement, la distinction entre endosomes précoces et tardifs doit être vue comme un continuum plutôt qu'une série d'étapes discrètes. De fait, la voie endosomale est constituée d'un remodelage dynamique de ces structures, conjointement avec une **maturation** et une **acidification** progressive de l'espace intravésiculaire.

Les corps multivésiculaires (ou MVBs) sont formés par la partie vacuolaire de l'endosome précoce. Ils migrent vers la région périnucléaire, et commencent à accumuler des petites vésicules intraluminales (ou ILVs) **sous la dépendance de la machinerie ESCRT (voir figures 1 et 2)**. Les récepteurs transmembranaires monoubiquitinés vont être sélectivement incorporés dans ces ILVs, puis déubiquitinés avant que la vésicule ne se détache complètement de la membrane externe de l'endosome. Ce mécanisme particulier de bourgeonnement s'opère donc depuis le cytosol vers la lumière de l'endosome.

L'endosome tardif (ou « late endosome ») est une version mature du corps multivésiculaire, où les protéines orientées vers la voie de recyclage ont disparu de la membrane externe, et avec une conversion complète de Rab5 en Rab7. A ce stade seulement, l'endosome tardif

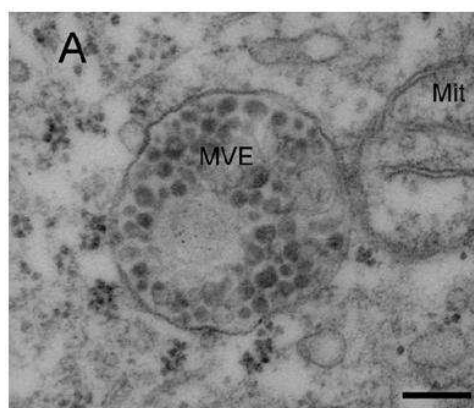


Figure 2 : Microscopie Electronique d'un corps multivésiculé (MVB), à proximité d'une mitochondrie (Mit). Echelle : 200 nm

Source : Wegner et al., 2011.

acquiert la capacité de fusionner directement avec le lysosome pour y dégrader son contenu.

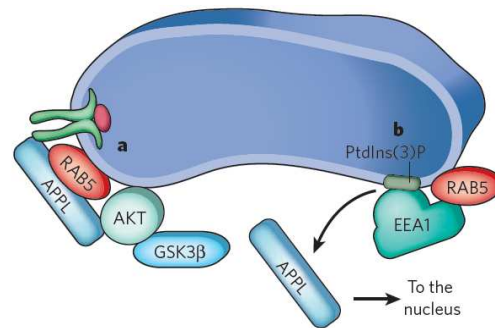
3. La matrice endosomale

L'internalisation des récepteurs transmembranaires et leur recyclage ont été intégrés depuis longtemps comme deux fonctions majeures de la voie endo-lysosomale : en ce sens, l'endocytose influence directement sur la signalisation au niveau de la membrane plasmique. Depuis quelques années, il apparaît que l'endosome joue également un rôle actif dans la transduction du signal lui-même (Alexander Sorkin and Mark von Zastrow, 2009 ; Catherine Sem Wegner, Lina M.W. Rodahl and Harald Stenmark, 2011) : de fait, la signalisation cellulaire et la voie endo-lysosomale sont deux mécanismes pouvant influencer l'un sur l'autre. Giorgio Scita et Pier Paolo Di Fiore ont résumé ces différents aspects sous le terme de « **matrice endosomale** » (Scita G, DiFiore PP, 2009). Ici, l'idée est que l'endosome peut servir de plateforme de recrutement pour des molécules de signalisation afin de réguler spécifiquement le destin d'une catégorie de récepteurs transmembranaires après internalisation. (**voir figure 3**)

Figure 3 : exemple de signalisation spécifique à l'endosome.

- A. Le récepteur à l'EGF recrute la protéine kinase Akt, par l'intermédiaire d'APPL et RAB5.
- B. EEA1 est un marqueur des endosomes précoces et entre **en compétition** avec APPL pour une interaction avec RAB5

Source : ScitaG, DiFiorePP, 2009.



L'endosome peut donc être vu comme une seconde plateforme, distincte de la membrane plasmique, où des molécules de signalisation vont être recrutées et intégrer plusieurs voies d'endocytose.

Dans ce contexte, l'internalisation des récepteurs par la machinerie ESCRT, depuis la membrane limitante de l'endosome vers les vésicules intraluminales (ILV), constitue également un point de décision important : il oriente directement le récepteur (lié ou non à son ligand) vers la voie de dégradation, en l'isolant du cytoplasme. Le récepteur à l'EGF, notamment, est orienté sélectivement vers les voies de dégradation ou de recyclage en fonction du ligand qu'il aura fixé. Le TGF- α oriente préférentiellement le récepteur vers le recyclage et l'EGF vers la dégradation : un des mécanismes à l'origine de ce tri sélectif semble être la stabilité du complexe récepteur-ligand à pH acide. L'interaction avec l'EGF étant plus stable au pH de l'endosome que le TGF- α , le premier complexe entraînera l'internalisation du récepteur dans les ILVs, alors que la dissociation du second complexe orientera le récepteur vers les voies de recyclage.

Ce phénomène a été étudié dans la signalisation de plusieurs autres récepteurs à tyrosine kinase, des récepteurs Toll-like, Wnt ou encore Notch. Au sein de la matrice endosomale, il semble donc que la machinerie ESCRT joue un rôle prépondérant dans ces mécanismes de signalisation.

Aussi nous aborderons dans ce manuscrit la thématique des protéines ESCRT selon deux aspects :

- **les propriétés de remodelage membranaire** de ces protéines ESCRT, en particulier leur capacité à former des vésicules intraluminales
- **le recrutement sélectif** des protéines ESCRT par d'autres protéines signal, notamment au niveau de la membrane de l'endosome précoce

II – La machinerie ESCRT

4. Présentation générale d'ESCRT

La machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) a été impliquée, au cours des dernières années, dans de multiples processus de remodelage membranaire et de nombreuses pathologies (voir figure 4). Elle est composée de quatre complexes multiprotéiques (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III), et comprend, à ce jour, au moins treize protéines différentes.

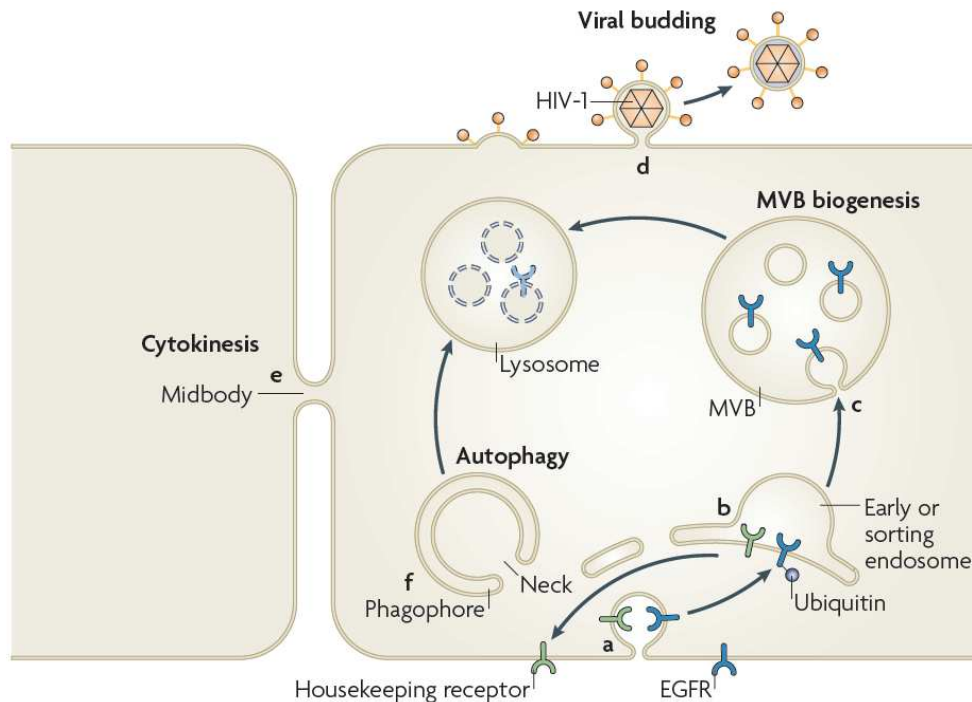


Figure 4: Les rôles biologiques d'ESCRT. (Hurley et Hanson, 2010)

Les récepteurs transmembranaires sont monoubiquitinés et endocytés depuis la membrane plasmique vers l'endosome précoce. (a) Les protéines ESCRT peuvent s'assembler à la surface limitante de l'endosome, afin de promouvoir la biogénèse des corps multivésiculés, et orienter ces récepteurs vers le lysosome (c). Alternativement, elles peuvent être recrutées au niveau de la membrane plasmique, et faciliter le bourgeonnement de certains virus enveloppés (d). On retrouve également les protéines ESCRT associées au corps intermédiaire, pendant la cytokinèse (e). Leur rôle dans la formation de l'autophagosome est en revanche hypothétique. (f)

4.1 Découverte des ESCRTs

Ce sont des travaux chez *Saccharomyces cerevisiae* (Emily M. Coonrod and Tom H. Stevens, 2010) qui ont permis leur découverte. Depuis les années 80, la levure sert de modèle simplifié pour l'étude de la voie endo-lysosomale, en raison des similarités **entre lysosome et vacuole**. Les mutants VPS (Vacuolar Protein Sorting) ont été impliqués dans les années 80 (Rothman et al., 1989) dans des défauts d'adressage de protéines vers la vacuole. Par des tests de complémentation, l'équipe de Scott Emr a distingué 33 groupes de gènes, eux-mêmes regroupés selon trois classes de mutants (A, B et C) sur des critères morphologiques: dès 1992, Raymond et al. complètent ces travaux en distinguant, outre ces trois

premières classes, de nouvelles classes sur critères morphologiques, **dont les mutants de classe E**. Chez ces derniers, l'espace pré-vacuolaire adopte une morphologie aberrante, **multilamellaire et multicisternale**, accumulant à la fois les protéines issues du golgi (néosynthétisées) et celles endocytées en route vers la vacuole. Au total, treize gènes ont ainsi été impliqués dans la genèse des compartiments de classe E.

Il faudra attendre les années 2000 pour que ces différents gènes, initialement définis comme gènes de classe E, soient associés au sein d'un même système : **le système ESCRT**. En 2001 et 2002, notamment, l'équipe de Scott Emr (Katzmann et al., 2001 ; Babst et al., 2002a, 2002b) caractérise ces protéines biochimiquement : ces treize gènes sont ainsi répartis en trois sous-ensembles, **les complexes ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III**. En raison de son rôle dans la reconnaissance de l'ubiquitine, le complexe HRS (composé de Hrs, anciennement Vps27), a été ultérieurement renommé ESCRT-0 (Raiborg et Stenmark, 2002).

A la même période, deux laboratoires (Garrus et al., 2001 ; Martin-Serrano et al., 2001) montrent que le VIH peut recruter un des composants d'ESCRT-I (Tsg101) par l'intermédiaire des domaines tardifs de la protéine gag, élargissant ainsi les rôles potentiels de la machinerie ESCRT. Depuis, la liste des interactions entre virus enveloppés et protéines VPS (Von Schwedler et al., 2003) s'est élargie, offrant ainsi un nouveau modèle d'étude pour la machinerie ESCRT chez les eucaryotes. ESCRT a été impliqué dans de multiples fonctions telles que le **contrôle du cycle cellulaire**, la **suppression de tumeurs**, la **régulation de certains promoteurs** (Slagsvold et al., 2006), la **cytokinèse** (Carlton and Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007 ; Spitzer et al., 2006), et plus récemment encore **l'étape d'abscission**. (Elia et al., 2011 ; Guizetti et al., 2011). De fait, en proposant de nouvelles fonctions associées à ESCRT, d'autres protéines ont complété le modèle initial jusque là dédié à la levure et à la formation des corps multivésiculaires dans les cellules eucaryotes.

4.2 Formation des ILVs: un mécanisme ordonné

Les complexes ESCRT sont des structures dynamiques, dont l'assemblage a été initialement déterminé chez la levure, et dont le premier rôle est la formation des vésicules intraluminales ainsi que la genèse des corps multivésiculés. On distinguera ici quatre complexes majeurs : **ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III**, complétés par un cinquième complexe comprenant l'ATPase **VPS4**. Les protéines impliquées dans ces complexes sont fortement conservées chez tous les organismes eucaryotes ainsi que de nombreuses archaebactéries, ce qui suggère une fonction cruciale de cette machinerie, ainsi qu'un mode d'action comparable.

Chez la levure, en observant l'accumulation de deux protéines cargo (la carboxypeptidase S et le récepteur Ste2) dans les corps multivésiculés de mutants VPS, Babst (Babst et al., 2002) propose un **assemblage séquentiel d'ESCRT** à la surface de l'endosome. Dans ce premier modèle, **ESCRT-0** par le biais de la protéine Hrs, se fixe à la protéine cargo ubiquitinylée et **vient recruter ESCRT-I**. **ESCRT-II** est à son tour recruté par ESCRT-I, et **active l'assemblage d'ESCRT-III sur la membrane de l'endosome**. Cet assemblage d'ESCRT-III entraîne la formation de la vésicule intraluménale ainsi que **l'accumulation de la protéine cargo** au point de bourgeonnement. Le cargo est enfin déubiquitinylé, avant internalisation dans les ILVs, par des **déubiquitinylases**.

Babst propose que les différents composants d'ESCRT-III soient **recyclés** par l'ATPase VPS4, afin que ceux-ci **ne s'accumulent pas** à la surface de l'endosome et réaliment le pool cytosolique **pour de nouveaux cycles de polymérisation (voir figure 5)**.

Il est étonnant de voir qu'en seulement trois papiers, l'équipe de Scott Emr ait ainsi posé les bases d'un modèle entier, attribuant à chaque complexe une fonction bien définie. Rétrospectivement, si on compare ce premier modèle paru en 2002 avec ceux de la littérature récente, on constate que beaucoup de ces hypothèses sont toujours d'actualité et que le modèle a été largement repris **chez la levure**, puis extrapolé à d'autres organismes eucaryotes ainsi que chez les archaebactéries. Selon ce premier modèle, ESCRT-III serait seul responsable de la formation de la vésicule. Ils attribuent encore à Vps4 une simple fonction de recyclage (Babst et al., 1998), sans rôle direct dans le remodelage membranaire.

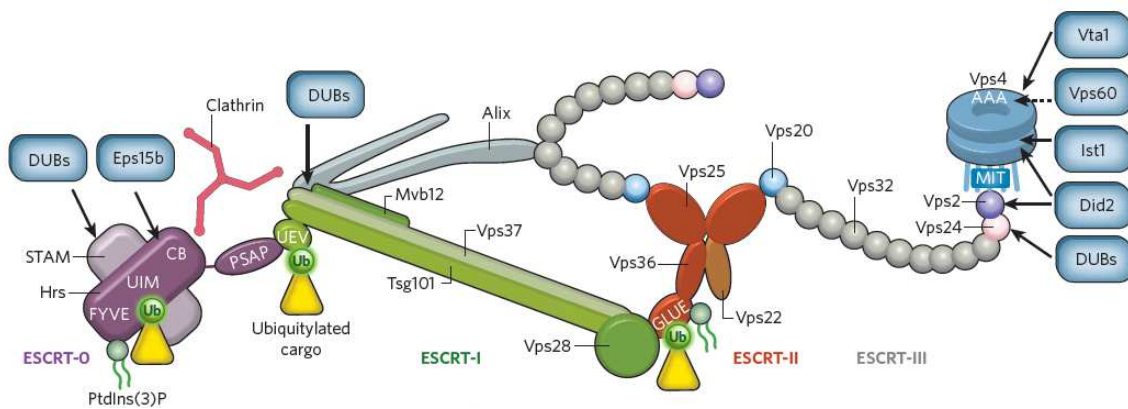
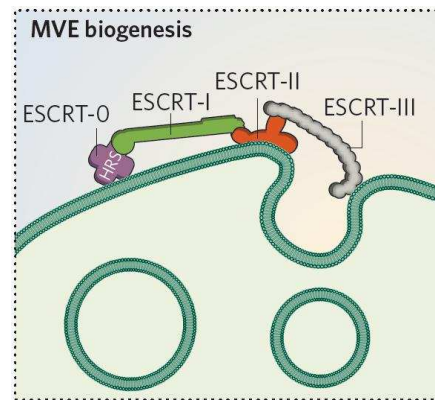


Figure 5: Modèle d'assemblage séquentiel d'ESCRT pour la formation des ILVs chez la levure. (d'après Raiborg et Stenmark, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009).

Ce modèle récent, paru en 2009, prend en compte les données relatives à la structure de chaque complexe chez la levure. **Dans ce modèle simplifié**, en deux dimensions, Vps4 intervient seulement en bout de chaîne sur un complexe ESCRT-III préformé. Les auteurs font ici figurer deux points de nucléation d'ESCRT, et considèrent seulement la polymérisation de Vps32/Snf7.



Cet assemblage séquentiel permettrait donc le bourgeonnement d'une vésicule depuis le cytosol vers le lumen. Récemment, une étape majeure a été réalisée à partir de vésicules unilamellaires (GUVs), afin de tester empiriquement ce modèle *in vitro* pour la levure (Wollert et al., 2009 ; 2010). Les auteurs ont produit des vésicules unilamellaires géantes, marquées à la rhodamine, et de composition similaire à celle des endosomes. Afin de déterminer le rôle d'ESCRT dans l'internalisation d'un cargo ubiquitinylé, ils ont suivi l'incorporation d'un fragment c-terminal de l'ubiquitine, fusionné à de la GFP. En introduisant dans le modèle expérimental chaque complexe ESCRT selon une séquence pré-établie (ESCRT-O, I, II puis III), Wollert et al., sont ainsi parvenus à identifier pour chaque complexe ESCRT

une fonction définie : ESCRT-0 semble donc être recruté spécifiquement par l'ubiquitine à la surface de la vésicule. En revanche, les auteurs observent dans ce modèle *in vitro* la formation d'un point de bourgeonnement médié par ESCRT-I et ESCRT-II : ici, les deux complexes colocalisent **à la base du bourgeon** (donc au niveau du « cou »), mais sans que ce dernier ne se détache du reste de l'endosome. C'est seulement en introduisant les protéines Vps20 puis Vps32/Snf7, faisant partie du complexe ESCRT-III, que le bourgeon évolue en vésicule intra-luménale. De fait, ces deux papiers apportent **au moins trois informations** essentielles à l'étude du système ESCRT chez la levure : (**voir figure 6**)

- La formation des ILVs peut être décomposée en **deux temps distincts**, à savoir le **bourgeonnement** (médié par ESCRT-I et ESCRT-II) puis la **scission** (médiée par ESCRT-III).
- Les complexes ESCRT colocalisent au niveau du cou du bourgeon. Le remodelage membranaire médié par ESCRT est donc bien distinct d'autres systèmes tels que la clathrine, COPII ou la dynamine.
- ESCRT-III ne serait responsable que de l'étape de scission, et la scission serait assurée par Vps20 et Snf7.

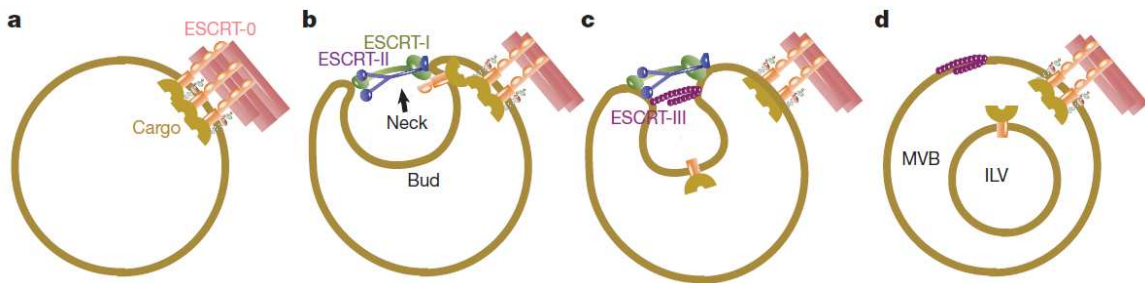


Figure 6: Modèle de remodelage membranaire médié par ESCRT chez la levure. (d'après Hurley et Hanson, Nature, 2010).

- ESCRT-0 séquestre le cargo par une interaction directe avec l'ubiquitine.
- ESCRT-I et ESCRT-II forment le point de bourgeonnement en stabilisant la base de la vésicule.
- ESCRT-III est recruté par ESCRT-II. ESCRT-III catalyse le détachement (**scission**).
- La vésicule intra-luménale est formée et le complexe ESCRT-III reste localement associé à l'endosome.

Si ces deux papiers veulent apporter une réponse définitive au rôle d'ESCRT chez la levure, ils ne permettent pas en revanche de proposer **un modèle physique** de ce remodelage (Bassereau, 2010). Les données structurales connues de ces complexes ne suffisent pas à expliquer leur rôle dans ce processus. Par ailleurs, il est évident que le système de cargo utilisé pour ces expériences est assez lointain d'un processus physiologique : à ce titre, l'intégration du cargo à la vésicule naissante (ici un fragment c-terminal de l'ubiquitine) n'est pas expliquée par ce modèle. Enfin, ce modèle suppose que l'assemblage et le mode d'action des protéines ESCRT soient bien conservés entre la levure et l'homme. Or, bien que certaines des protéines impliquées présentent de fortes homologies, elles ne sont pas toutes strictement identiques.

Les auteurs, en testant la séquence d'assemblage proposée par Scott Emr, n'attribuent aucun rôle direct à Vps2, Vps24 et Vps4 dans le mécanisme de scission, dans la mesure où celui-ci intervient en leur absence. Dans ce modèle, Vps24 puis Vps2 viendraient « seulement » **coiffer un polymère Snf7**, afin de recruter Vps4. **Vps4 désassemblerait l'ensemble du complexe ESCRT-III (recyclage)**, toujours associé à la membrane, pour réalimenter le pool cytosolique d'ESCRT et ainsi permettre la survenue d'un nouveau cycle d'assemblage in vitro.

La taille des vésicules intraluminales obtenues in vitro est en revanche beaucoup plus importante que celles observées in vivo (1-2 μm contre 25-60 nm) : la question se pose donc de savoir si le modèle ainsi proposé correspond bien, dans les détails, à une situation **physiologique**, ou si le système est **contraint** dans une direction.

Les questions persistant à ce jour restent donc liées à la fois aux **bases structurales** et au **modèle physique** expliquant ce remodelage.

4.3 Recrutement du cargo : rôle d'ESCRT-0

Le complexe ESCRT-0 est formé des protéines Hrs et STAM chez l'humain, Vps27 et Hse1 chez la levure (Asao, 1997 ; Bache, 2002). Chez l'humain, on retrouve **deux isoformes** de STAM (STAM1 et STAM2), alors que la levure n'en possède qu'un. Dans le cytosol, Hrs et STAM s'associent de façon constitutive **selon un ratio de 1:1** (Ren et al., 2010). Il a été proposé récemment que ce complexe pouvait également former un **hétérotétramère** en présence de membrane lipidique (Mayers et al., 2011).

L'interaction entre Hrs et STAM est médiée par un enchevêtrement de leurs domaines GAT respectifs : l'ensemble, constitué principalement de quatre hélices antiparallèles, forme le cœur du complexe. Les simulations monte-carlo sur le complexe ESCRT-0 (voir figure XIV) montrent que ce dernier est en conformation ouverte, et que les différents domaines de Hrs et STAM sont accessibles au solvant (**voir figure 7**).

Hrs et STAM possèdent tous deux un domaine VHS en n-terminal. Les domaines VHS se retrouvent majoritairement dans des protéines impliquées dans le trafic cellulaire (Lohi and Lehto, 1998). Ils sont structurés en bundles de huit hélices (Mao et al, 2000; Misra et al, 2000), et ont été impliqués depuis dans des interactions protéine-protéine (Nielsen et al, 2001; Puertollano et al, 2001; Takatsu et al, 2001; Zhu et al, 2001). Le domaine VHS de STAM interagit **préférentiellement avec l'ubiquitine** (Mizuno et al., 2003), ainsi que le domaine VHS de Hrs mais avec une plus faible affinité (Ren et al., 2009, Ren et al., 2010). Hrs et STAM possèdent respectivement un domaine DUIM et UIM, également capables d'interagir avec l'ubiquitine. Le domaine DUIM possédant deux sites d'interaction avec l'ubiquitine, Hrs peut donc potentiellement interagir avec deux résidus ubiquitine simultanément (Hirano et al., 2006). Récemment, des études par SPR ont permis d'identifier un phénomène d'avidité lié à la redondance de ces sites d'interaction avec l'ubiquitine (Ren et al., 2010). Potentiellement, ESCRT-0 peut donc interagir **avec cinq ubiquitines simultanément**. En revanche, l'affinité pour les tétraubiquitines K48- et K63- Ub₄ (de l'ordre de 20-50 μM) excède d'un facteur 10 celles de la monoubiquitine ou de la diubiquitine (de l'ordre de 500 μM). Ces observations suggèrent donc qu'ESCRT-0 puisse interagir **selon plusieurs modes**, à la fois sur des cargos **monoubiquitinés** et **polyubiquitinés**. Il est encore possible que l'interaction avec une membrane lipidique augmente l'affinité pour des cargos monoubiquitinés (Wollert

et al., 2010) par un processus similaire, bien que tous ces modèles restent à tester de façon plus physiologique.

Hrs peut également interagir avec la chaîne lourde de la clathrine, à partir d'un motif c-terminal (Raiborg et al., 2001), et avec Eps15b (Roxrud et al., 2008). Au contact de la membrane de l'endosome, ESCRT-0 interagit directement avec le phosphoinositol 3-phosphate par l'intermédiaire du domaine FYVE de Hrs (Gaulhier et al., 1998, Sankaran et al., 2001 ; Stahelin et al., 2002). ESCRT-0 possède donc de multiples points d'ancrage potentiels à la membrane de l'endosome, soit directement (par l'intermédiaire du PI3P) soit indirectement (par le biais de la clathrine ou de l'ubiquitine notamment).

ESCRT-0 est capable de recruter les déubiquitinyases UBPY et AMSH (Tanaka, 1999 ; Kato et al., 2000) par le domaine SH3 de STAM. En recrutant ces enzymes, une hypothèse est **que le cargo puisse être déubiquitinylé avant son incorporation dans les ILVs.**

En outre, ESCRT-0 est capable de séquestrer les cargos ubiquitinylés au niveau de la membrane de l'endosome dans des microdomaines enrichis en LBPA, puis de recruter le complexe ESCRT-I (Kristi et al., 2003) . L'interaction avec ESCRT-I se fait par le domaine UEV (Ubiquitin E2 variant) de TSG101 (Bache et al., 2003; Pornillos et al., 2003), avec **le motif PSAP** (PSDP pour Vps27). Bien qu'une structure de ce complexe soit disponible, la façon dont ESCRT-0 va pouvoir recruter ESCRT-I en association avec le cargo est moins claire in vivo : la nature flexible d'ESCRT-0, récemment reconstituée in silico (Ren et al., 2009), suggère qu'ESCRT-0 soit capable de rapprocher le motif PSAP (donc ESCRT-I) et le domaine d'interaction à l'ubiquitine (donc la protéine cargo). En revanche, la manière dont cette « passation » pourrait être coordonnée dans l'espace est à ce jour très évasive.

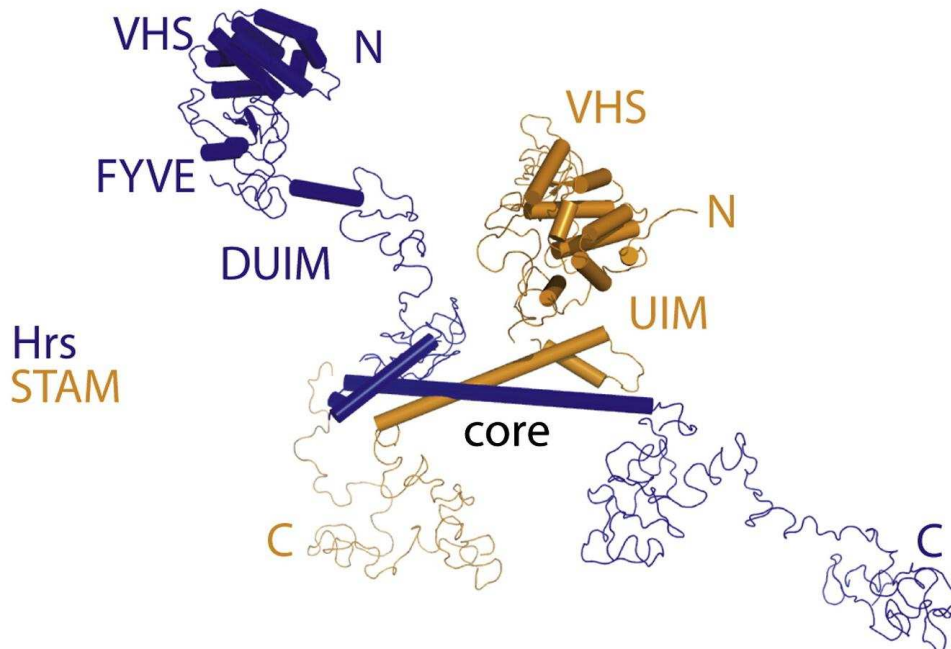
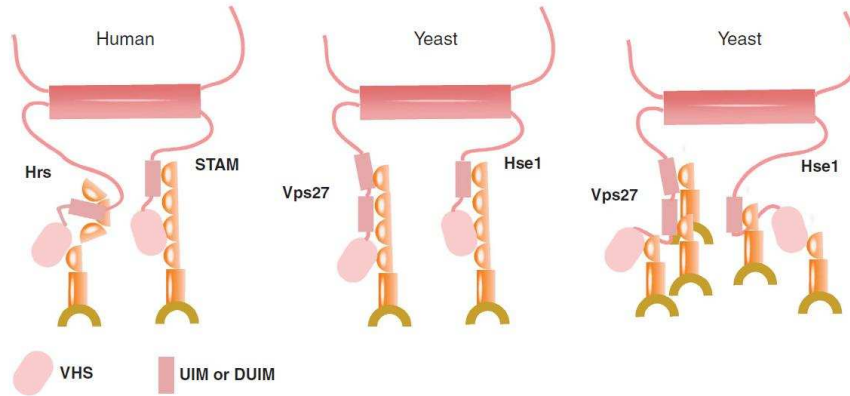


Figure 7: Structure du complexe ESCRT-0 humain en solution.

(d'après Ren et al., Structure, 2009 ; EMBO J. 2010)

Sur la base des structures cristallographiques connues du complexe ESCRT-O, les auteurs reconstituent à partir d'une simulation Monte-Carlo un possible modèle d'ESCRT-0 en solution. Le cœur du complexe est formé de l'association antiparallèle des parties hélicales (voir schéma ci-dessus) de Hrs et STAM.

5. Organisation d'ESCRT-I et ESCRT-II

5.1 Structure d'ESCRT-I

ESCRT-I est un tétramère stable, constitué chez la levure de quatre sous-unités : Vps23 (ou TSG101 chez les eucaryotes supérieurs), Vps28, Vps37 et Mvb12 (Teo et al., 2006 ; Chu et al., 2006 ; Oestreich, 2006 ; Curtiss, 2006; Kostelansky, 2007) . Chez la levure, on ne retrouve qu'un seul exemplaire de ces sous-unités, tandis que les mammifères possèdent trois isoformes de VPS37 (VPS37A, B, C) et deux isoformes de MVB12 (MVB12A et MVB12B). Très récemment, UBAP1 a également été impliquée dans la formation d'un complexe ESCRT-I stable et comprenant l'isoforme VPS37A (Stefani et al., 2011) : cette nouvelle donnée suggère donc l'existence de **plusieurs complexes ESCRT-I** différents avec des fonctions cellulaires spécifiques. Pour cette introduction, nous nous bornerons à la description du complexe ESCRT-I « canonique », tel que défini chez la levure. La partie C-terminale de Vps28 recrute directement la sous-unité Vps36 d'ESCRT-II, tandis que le domaine UEV (Ubiquitin E2 Variant) de Vps23 interagit avec ESCRT-0 (voir précédemment). Enfin, la partie N-terminale de Vps37 est basique, prédite comme hélicale, et contribue à l'interaction du complexe avec des membranes biologiques. (Kostelansky, 2007).

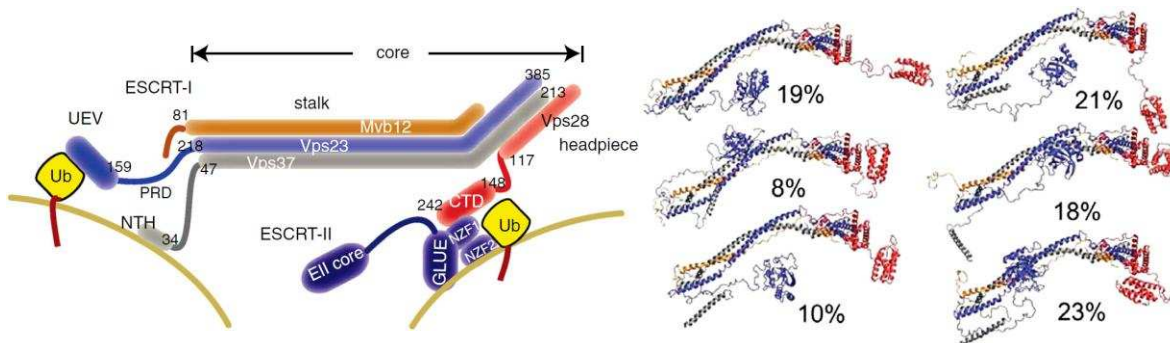


Figure 8: Structure du complexe ESCRT-I chez la levure (d'après Boura et al., 2011) A partir des données cristallographiques de fragments ainsi que d'un modèle SAXS d'ESCRT-I, les auteurs proposent un modèle d'ESCRT-I (levure) en solution. Le cœur du complexe ESCRT-I est assimilé à une tige rigide d'environ 13 nm. Les extrémités présentent des régions hypermobiles, alternant entre un stade fermé (replié sur le cœur du complexe) et un stade ouvert.

La structure du complexe ESCRT-I révèle un hétéro-tétramère composé d'une tige rigide de 2nm de diamètre, et longue de 13 nm (Kostelansky, 2007 ; Boura et al., 2011). La tige (ou « stalk ») est composée principalement de **Mvb12, Vps23 et Vps37**, tandis que Vps28 participe avec Vps23 et Vps37 à la formation de la tête (ou « headpiece »). A ce jour, aucune structure cristallographique du complexe entier n'a été publiée, probablement en raison de la flexibilité inhérente aux extrémité N- et C-terminales des protéines composant ESCRT-I. En revanche, des structures partielles de ces extrémités sont connues, seules ou en complexe (voir figure 8).

ESCRT-I interagit avec l'ubiquitine par le domaine UEV de Vps23, ainsi que la partie C-terminale de Vps28. Les domaines UEV chez la levure et l'homme, seul ou en complexe avec l'ubiquitine ont été cristallisés et/ou résolus par RMN (Pornillos et al., 2002b ; Sundquist, 2004 ; Palencia, 2006) : leur structure est proche des domaines UEV retrouvés dans les enzymes E2, avec toutefois la présence d'une

hélice supplémentaire en N-terminal, et l'absence de deux hélices en C-terminal : on parlera donc plutôt d'une structure UEV-like. Leur affinité pour l'ubiquitine est en revanche très faible (500µM), similaire aux domaines VHS d'ESCRT-0. Plus récemment (Shields et al, 2009), un second point de contact avec l'ubiquitine a été déterminé sur Mvb12 par RMN : comme pour ESCRT-0, **l'association de plusieurs points de contacts à l'ubiquitine permettrait à ESCRT d'accomoder différents types de cargo simultanément.**

L'extrémité C-terminale (ou CTD) de Vps28 est composée de quatre hélices (Pineda et al. 2006), et peut lier ESCRT-II en interagissant avec Vps36 sur deux surfaces distinctes, les domaines NZF (N-Zinc Finger), avec une forte affinité de 57 nM (Gill et al., 2007). Le domaine CTD de Vps28 pourrait interagir directement avec Vps20/CHMP6, donc ESCRT-III (Pineda et al., 2006). Cette interaction suggère que cette extrémité joue un rôle de plateforme dans la mise en place d'ESCRT-II et ESCRT-III, au niveau du cargo ubiquitinylé. Dans le même papier, les auteurs montrent que la protéine Vps28 en solution existe **sous une forme à la fois monomérique et dimérique**, sur la base du profil d'élution et d'expériences de cross-link. La partie N-terminale de Vps28 est nécessaire au maintien de cette forme dimérique : en revanche la partie C-terminale reste monomérique en solution, bien qu'elle cristallise sous la forme d'un dimère parallèle. En revanche, les données basse-résolution du complexe ESCRT-I en solution (Boura et al., 2011) ne montrent qu'une forme monomérique : de fait, il est difficile sur la base de ces seules données de proposer un modèle d'oligomérisation d'ESCRT-I. On ne peut en revanche exclure qu'une telle dimérisation/oligomérisation puisse avoir un rôle **transitoire** dans la formation des corps multivésiculés, mais cette possibilité reste à vérifier expérimentalement.

5.2 Structure d'ESCRT-II

ESCRT-II est un complexe stable, formé de deux copies de VPS25, et d'une copie de VPS36 et VPS22 (**voir figure 9**). La structure cristallographique montre un aspect trilobé : deux des lobes sont formés par VPS25, tandis que le troisième lobe est formé par VPS36 et VPS22.

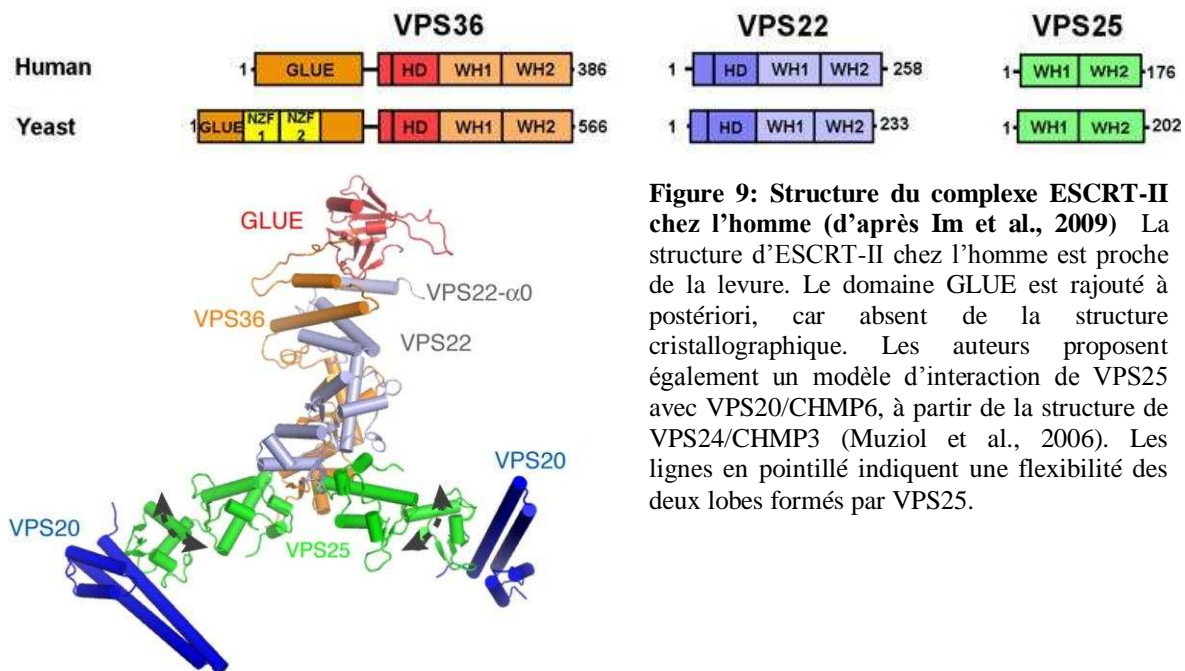


Figure 9: Structure du complexe ESCRT-II chez l'homme (d'après Im et al., 2009) La structure d'ESCRT-II chez l'homme est proche de la levure. Le domaine GLUE est rajouté à postériori, car absent de la structure cristallographique. Les auteurs proposent également un modèle d'interaction de VPS25 avec VPS20/CHMP6, à partir de la structure de VPS24/CHMP3 (Muziol et al., 2006). Les lignes en pointillé indiquent une flexibilité des deux lobes formés par VPS25.

ESCRT-II peut interagir avec ESCRT-I par l'intermédiaire du domaine GLUE de VPS36 (Teo et al., 2006) : Vps36 chez la levure possède deux motifs en doigt de zinc (NZF1 et NZF2) capables d'interagir respectivement avec l'extrémité c-terminale de Vps28 (ESCRT-I) et l'ubiquitine. Chez l'homme, ces deux motifs sont absents de la structure primaire ; en revanche, l'interaction de GLUE avec Vps28 et l'ubiquitine est bien conservée (Slagsvold, 2005).

Chez la levure, le domaine GLUE participe à l'interaction d'ESCRT-II avec des vésicules enrichies en PtdIns3P (Teo et al., 2006). Ce site d'interaction avec des membranes biologiques n'est pas spécifique du PtdIns3P, mais s'étend à d'autres types de phosphoinositides, notamment le PtdIns4P, le PtdIns(3,4)P₂, et le PtdIns(3,5)P₂. Il s'agit d'un point de différence important avec ESCRT-I, pour lequel la spécificité du PtdIns3P est beaucoup plus marquée. Le domaine GLUE peut donc interagir simultanément, et indépendamment, avec ESCRT-I, l'ubiquitine, et la tête polaire du PtdIns3P. L'hélice $\alpha 0$ de VPS22 semble également participer à l'interaction d'ESCRT-II avec des membranes biologiques (Im et al., 2008), en association avec le domaine GLUE, sur des liposomes PC:PE:PI (75:20:5).

ESCRT-II recrute deux copies de VPS20/CHMP6 à partir de VPS25, avec une affinité de l'ordre du microMolaire (7 μ M). Cette interaction conduit donc à la formation de deux complexes VPS20:VPS25 distincts (Im et al., 2009). Ces interactions sont médiées par plusieurs résidus de la face concave de VPS25 dans la structure cristallographique, et la mutation de certains de ces résidus conduit à l'abolition de cette interaction. VPS20 est co-cristallisée à partir d'un fragment de l'hélice $\alpha 1$: dans le cristal, le fragment minimal interagissant avec VPS25 est composé principalement des résidus 11 à 35, soit l'extrémité N-terminale de $\alpha 1$, et implique treize résidus. Sur la base des structures du complexe VPS20-VPS25, ainsi que de la structure d'ESCRT-II seul, les auteurs ont replacé cette interaction dans le contexte d'une membrane lipidique. Cependant, l'orientation des deux molécules VPS20 rend **incompatible** la

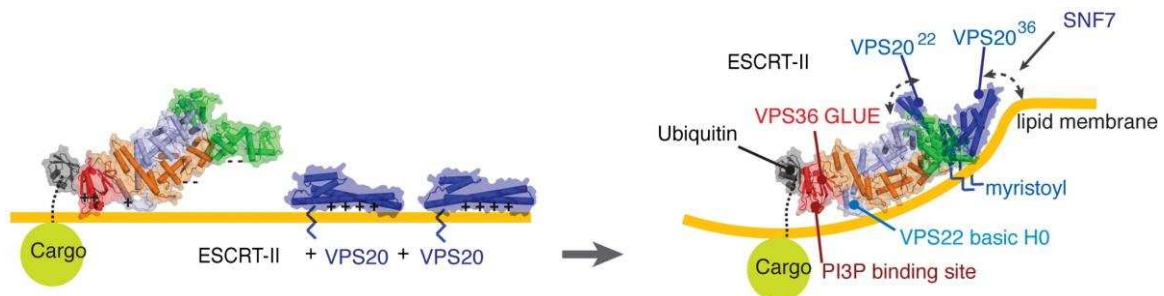
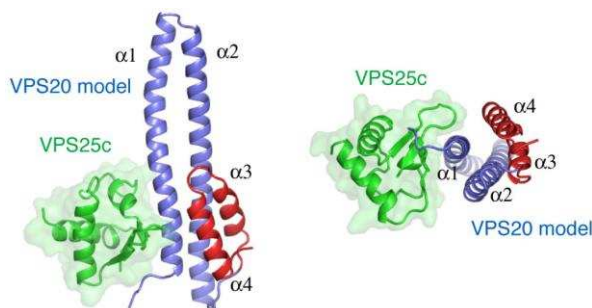


Figure 10: Modèle intégré d'ESCRT-II chez l'homme (d'après Im et al., 2009). A partir de la structure d'ESCRT-II (fig. XVII), les auteurs positionnent le domaine GLUE de VPS36, en complexe avec l'ubiquitine. Sur la base des sites d'interaction connus avec ESCRT-III, les auteurs placent VPS20 en complexe au niveau de la face concave de la sous-unité VPS25. La membrane lipidique est représentée par une ligne jaune : son orientation est définie à partir des deux sites d'interaction connus d'ESCRT-II. Le complexe ESCRT-II :VPS20 ne peut être reformé qu'en imposant une courbure de la



fixation du domaine GLUE et de VPS22 à une membrane lipidique plane. Les auteurs parviennent à résoudre ce paradoxe en imposant *in silico* une courbure de la membrane compatible avec un phénomène de remodelage membranaire. (**voir figure 10**)

Ainsi, Im et al. proposent un mécanisme où ESCRT-II recruterait ESCRT-III par l'intermédiaire de VPS20, dans le contexte d'un processus de bourgeonnement.

5.3 Rôle d'ESCRT-I et ESCRT-II dans l'initiation du bourgeonnement

L'étape de bourgeonnement, soit la formation d'une vésicule encore connectée à la membrane limitante de l'endosome, est médiée par l'action conjointe d'ESCRT-I et ESCRT-II (Wollert et al., 2010). En outre, les auteurs montrent que l'action isolée de l'un ou l'autre de ces complexes n'entraîne la formation d'aucun bourgeon : selon le modèle actuel, ce serait donc bien la **formation d'un supercomplexe ESCRT-I/ESCRT-II** qui entrainerait cette étape de remodelage membranaire indépendamment d'ESCRT-III. La structure d'ESCRT-II en complexe avec VPS20/CHMP6 suggère en effet que, physiologiquement, le recrutement d'ESCRT-III serait optimal dans le contexte d'une surface membranaire déjà incurvée, et donc un bourgeon déjà formé. En revanche aucune structure cristallographique du supercomplexe ESCRT-I/ESCRT-II n'existe à ce jour, et les modèles en solution d'ESCRT-I et ESCRT-II ne permettent pas de conclure sur d'éventuelles propriétés physiques d'un tel échaffaudage. De plus rien ne permet, en l'état, de considérer qu'à un événement de bourgeonnement corresponde un seul complexe ESCRT-I ou ESCRT-II : de fait, la stochiométrie des protéines impliquées est encore hypothétique, de même que d'éventuelles modifications post-traductionnelles en cours de bourgeonnement. (**voir figure 11**)

En l'état, les bases physiques de ce bourgeonnement ESCRT-III indépendant sont donc purement spéculatives.

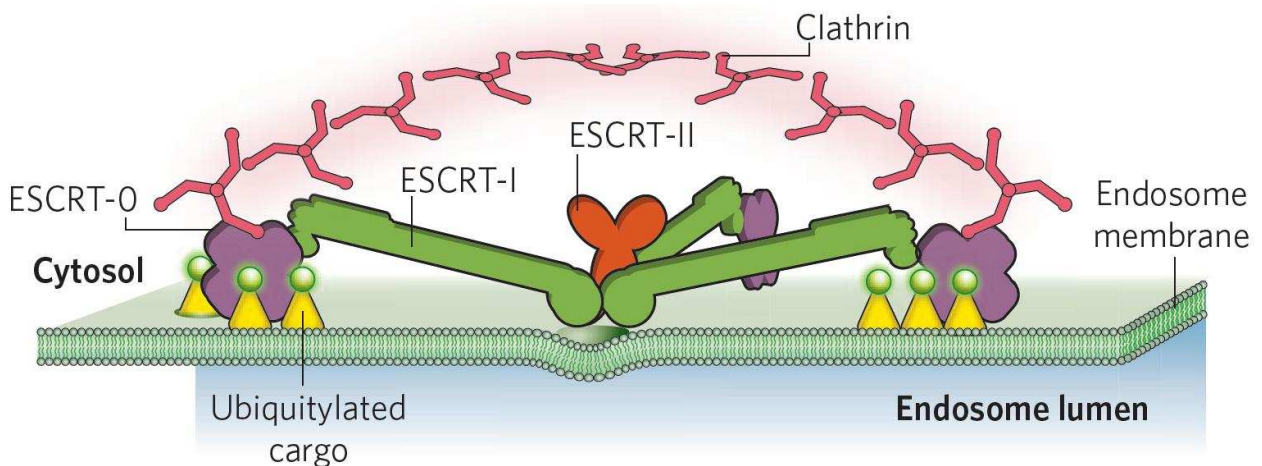


Figure 11: Modèle d'involution de la membrane par ESCRT-I et ESCRT-II (d'après Raiborg et Stenmark, 2009). ESCRT-O concentre le cargo ubiquitinylé au niveau de microdomaines, associés aux puits de clathrine. Il recrute ESCRT-I, qui lui-même vient recruter ESCRT-II. L'action conjointe d'ESCRT-I et ESCRT-II marquerait le point de bourgeonnement, selon un mécanisme et une stochiométrie encore mal définis.

6. Rôles et structure d'ESCRT-III

ESCRT-III est un complexe **dynamique**, capable de **polymériser** au niveau de la membrane des endosomes, et de **stochiométrie mal définie** (Babst et al., 2002): contrairement à ESCRT-I et ESCRT-II, le complexe **ESCRT-III ne constitue donc pas un ensemble stable**. Dans un souci de clarté, on utilisera la nomenclature des protéines ESCRT-III chez l'homme, sauf mention :

On notera que la levure possède seulement un isoforme de chaque protéine (à l'exception de CHMP7), alors que les eucaryotes supérieurs possèdent trois isoformes de CHMP4, ainsi que deux isoformes de CHMP2 et CHMP1. Au total, le système ESCRT est composé de sept protéines différentes chez la levure, et de 12 protéines chez les mammifères.

Complexe	Homme	Levure
ESCRT-III	CHMP6	Vps20
	CHMP4A, B, C	Vps32/Snf7
	CHMP3	Vps24
	CHMP2A, B	Vps2
ESCRT-III like	CHMP1A, B	Vps46/Did2p
	CHMP5	Vps60/Mos10
	IST1	Ist1
	CHMP7	-

6.1 Structure générale des protéines CHMPs

A l'exception de CHMP7 (Horii et al., 2006), les protéines CHMP sont longues d'environ 220 acides aminés, caractérisées par une répartition inégale de leurs charges, et présentent une partie n-terminale basique et une partie c-terminale acide (**voir figure 12**). Les données à notre disposition, basées sur les structures de CHMP3 (Muziol et al., 2006 ; Bajorek et al., 2009) et de Ist1 (Xiao et al., 2009 ; Bajorek et al., 2009), ainsi que les prédictions de structures secondaires, suggèrent un repliement commun à toutes les protéines CHMP (Babst et al., 2002 ; Muziol et al., 2006 ; Xiao et al., 2009). Elles sont en général composées de six hélices, bien que leur nombre et leur longueur puissent varier sensiblement (**voir figure 12, 13**). Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ forment une structure en épingle à cheveux, et font suite à une extrémité n-terminale désordonnée. Les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ se replient respectivement sur les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 1$. Dans la structure de CHMP3 publiée par Bajorek et al., l'hélice $\alpha 5$ se replie sur la partie n-terminale d' $\alpha 2$. Enfin, l'hélice $\alpha 6$ ainsi que la région entre $\alpha 4$ et $\alpha 5$ n'apparaissent pas dans cette structure cristallographique et sont libres en solution, sans contact avec le cœur de la protéine en solution (Rozicky et al., 2011).

Des fragments des protéines CHMP6 (Kieffer et al., 2008 ; Im et al., 2009), CHMP1A (Kieffer et al., 2008), CHMP1B (Yang et al., 2008) et CHMP2B (Stuchell-Brereton et al., 2007) ont également été rapportés en complexes, mais à ce jour aucune autre structure CHMP n'a été déterminée sous sa forme complète.

En outre, CHMP6 peut être modifiée post-traductionnellement (Yorikawa et al., 2006) par myristoylation *in vivo*, à partir d'un site consensus en n-terminal. Cette modification jouerait un rôle dans le recrutement à la membrane, notamment par le biais du PtdIns3P. En revanche cette modification semble propre à CHMP6 et n'a pas été rapportée chez les autres protéines CHMP.

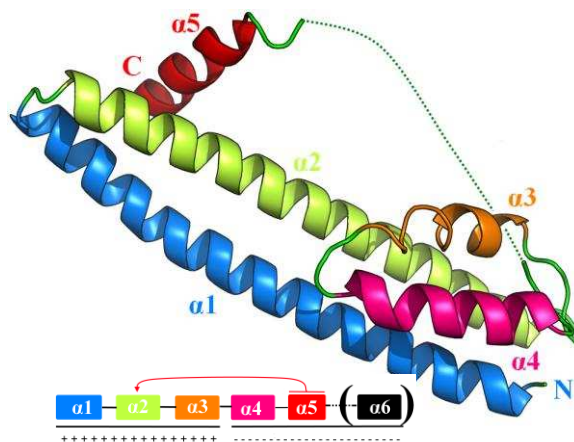


Figure 12: Les protéines CHMP partagent la même structure tertiaire. La structure de CHMP3 (8-222) (Bajorek et al., 2009) est utilisée comme référence. L'hélice $\alpha 6$ n'est pas visible dans la structure cristallographique, probablement libre en solution, et n'est donc pas représentée. L'hélice $\alpha 5$ interagit avec l'hélice $\alpha 2$ sous sa forme autoinhibée.

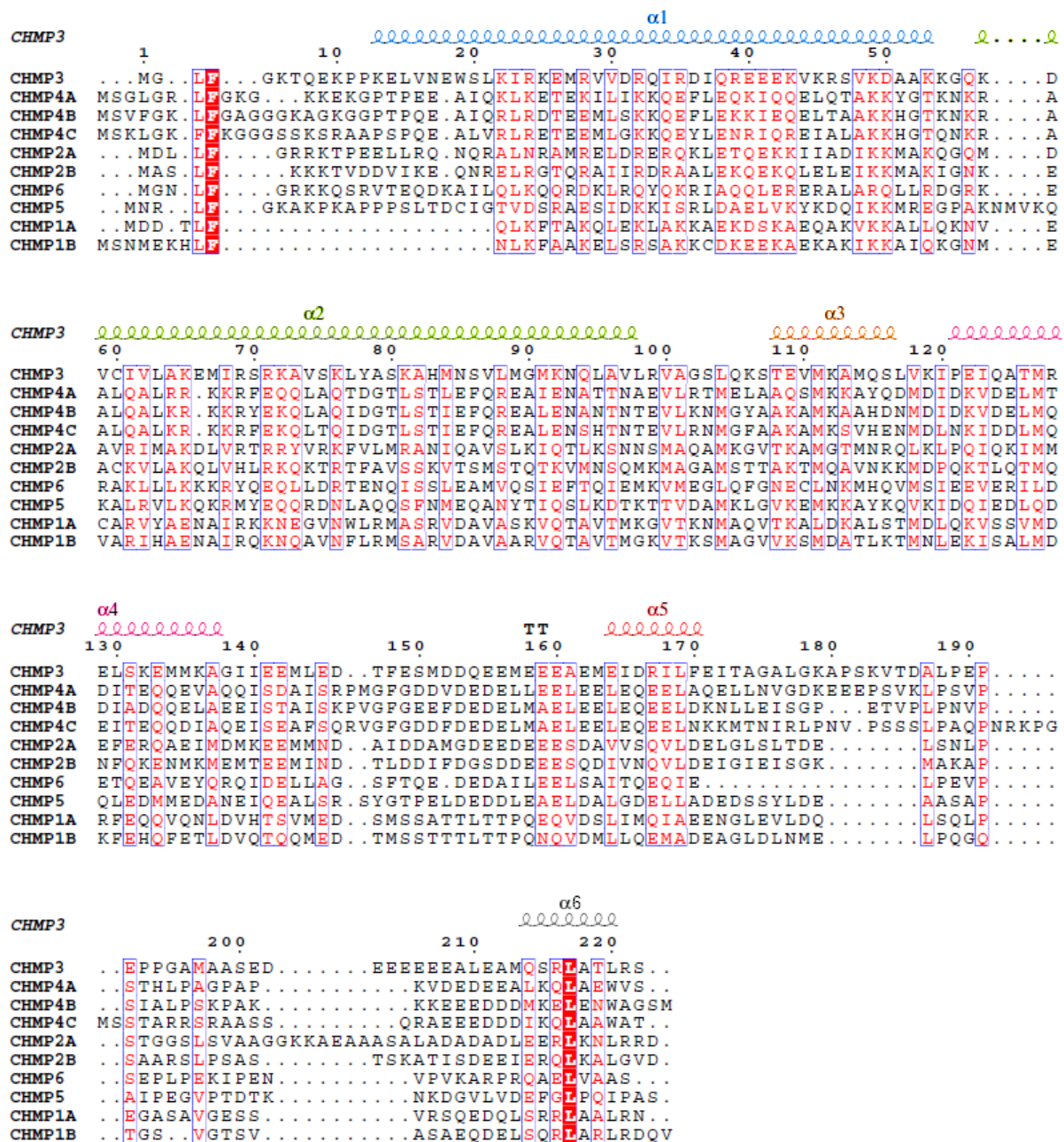


Figure 13: les protéines CHMP ont un repliement similaire mais une structure primaire peu conservée.

La séquence primaire des protéines CHMP1-6 humaines est alignée sous ClustalW, et la figure générée par EsPrript avec CHMP3 comme référence pour l'assignation des structure secondaires. Les protéines Ist1 et CHMP7 ne sont pas incluses car trop divergentes.

6.2 Le principe d'autoinhibition

Les protéines CHMP alternent entre une forme inactive, **soluble et cytosolique**, et une forme dite active, **capable d'interagir avec la membrane des endosomes** (Babst et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que CHMP3 pouvait spécifiquement interagir avec le PtdIns(3,5)P₂ (Whitley et al., 2003), et la partie n-terminale de CHMP4 (composée des hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$) avec le PtdIns3P préférentiellement (Lin et al., 2005). Une hypothèse simple est donc que, in vivo, la capacité des protéines CHMP à s'associer aux membranes et à polymériser puisse être régulée par un changement conformationnel (ou « activation ») qui démasquerait la partie n-terminale (**voir figure 14**). En surexprimant des versions tronquées de ces protéines CHMP, deux équipes ont ainsi pu montrer (Zamborlini et al., 2006 ; Shim et al., 2007) que la partie c-terminale était responsable de l'autoinhibition. La délétion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ conduit ainsi à la relocalisation des protéines CHMP au niveau de la membrane plasmique et/ou de vacuoles, ce qui suggère qu'une interface critique à leur interaction est démasquée. La surexpression de protéines marquées en c-terminal avec une étiquette volumineuse (type GFP) produit des effets similaires. Les bases de cette autoinhibition (Muziol et al., 2006 ; Bajorek et al., 2009)

ont été éclaircies avec les structures d'Ist1 et CHMP3. Initialement, Muziol et al., ont montré qu'une construction de CHMP3 tronquée des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ en C-terminal pouvait dimériser in vitro, contrairement aux protéines sauvage et tronquées seulement de $\alpha 6$. Un autre papier montre que CHMP3 (9-222) peut, en présence d'une forte concentration saline (Lata et al., 2008), exister sous une forme ouverte et sous une forme fermée. Or, Bajorek et al. montrent sur la base des structures connues de CHMP3 que des mutations perturbant seulement l'interaction entre $\alpha 5$ et $\alpha 2$ stimulent la polymérisation d'ESCRT : un modèle simple attribuerait donc à l'hélice $\alpha 5$, **et non $\alpha 6$** , cette autoinhibition.. L'activation des protéines CHMP résulterait donc principalement de la déstabilisation de l'interface $\alpha 5/\alpha 2$, et démasquerait une ou plusieurs autres interfaces impliquées dans la polymérisation et/ou interactions protéine/protéine. Les phénotypes dus à la délétion simple de **$\alpha 6$** seraient donc **distincts de ceux liés à l'autoinhibition**, car liés en partie à la **perte d'une interaction avec VPS4** (voir plus loin).

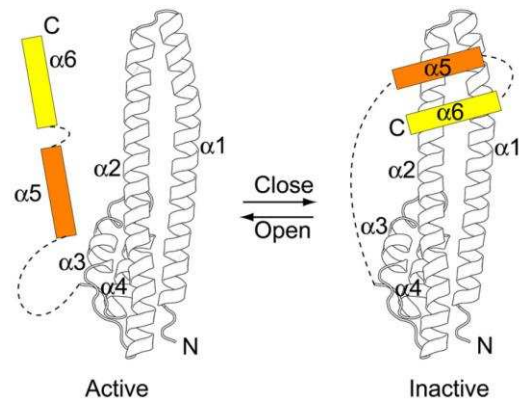


Figure 14 : CHMP3 existe sous une forme active, dite « ouverte », et sous une forme inactive, dite « fermée » (d'après Xiao et al., 2009). Sous sa forme inactive, CHMP3 est préférentiellement cytosolique. Sous sa forme active, elle s'associe à la membrane des endosomes et participe à la formation d'ESCRT-III.

6.3 Les différents polymères ESCRT

La surexpression de CHMP4A et CHMP4B dans des cellules COS-7 conduit à l'apparition de filaments d'environ 5 nm de diamètre (Hanson et al., 2008), s'assemblant de façon concentrique pour former des structures circulaires de près de 100 nm au niveau de la membrane plasmique. Occasionnellement, des striations transversales montrent une périodicité de 4 nm. Bien que la présence de polymères ESCRT-III ait déjà été mise en évidence (Babst et al., 2002), ce papier montre pour la première fois des polymères ESCRT-III par microscopie électronique, attachés à la membrane plasmique : plus surprenant encore, la coexpression d'un mutant dominant-négatif de l'ATPase VPS4 entraîne la formation

de protrusions au niveau de ces polymères. La composition de ces protrusions n'est pas connue ; en revanche, cette modification de topologie est dépendante de CHMP4 et de VPS4. De fait, les auteurs montrent également pour la première fois **un lien entre polymérisation et bourgeonnement**.

Cette capacité de polymérisation en tubes et/ou anneaux a aussi été rapportée pour CHMP2A et CHMP3 (Lata et al., 2008b ; Bajorek et al., 2009). Des mélanges équimolaires, ou avec un excédent de CHMP3, conduisent à la formation d'hétéropolymères, semblables à des tubes, d'environ 50 nm de diamètre. Ces tubes peuvent, dans certains cas, atteindre 1-2 μM de longueur, et adopter à l'une de leurs extrémités une structure conique **terminée par un dôme**. Dans un cas (Lata et al., 2008b), des tentatives de reconstruction par cryo-EM ont permis de placer le dimère cristallographique CHMP3 (Muziol et al., 2008) dans l'épaisseur du tube. En revanche la résolution du modèle n'a pas permis d'identifier sans ambiguïté les surfaces impliquées dans cette macro-structure.

Des homopolymères CHMP2A (Lata et al., 2008b), CHMP4B (Ghazi-Tabatabai, 2008 ; Pires et al., 2009), CHMP1B (Bajorek et al., 2009), Ist1 (Bajorek et al., 2009), et Vps24 (Ghazi-Tabatabai, 2008) ont également été rapportés dans la littérature. Certains forment des anneaux (CHMP2A, CHMP4B), d'autres plutôt des hélices (Vps24), voire des tubes (Ist1) ; cette variabilité de formes ne permet pas en revanche de déterminer la fonction de ces différentes structures ni leur ordre d'assemblage. Les dimensions de certains de ces polymères excédant très largement les ordres de grandeur des vésicules intraluminales, **il reste à démontrer que ces macrostructures puissent toutes se former in vivo. (voir figure 15)**

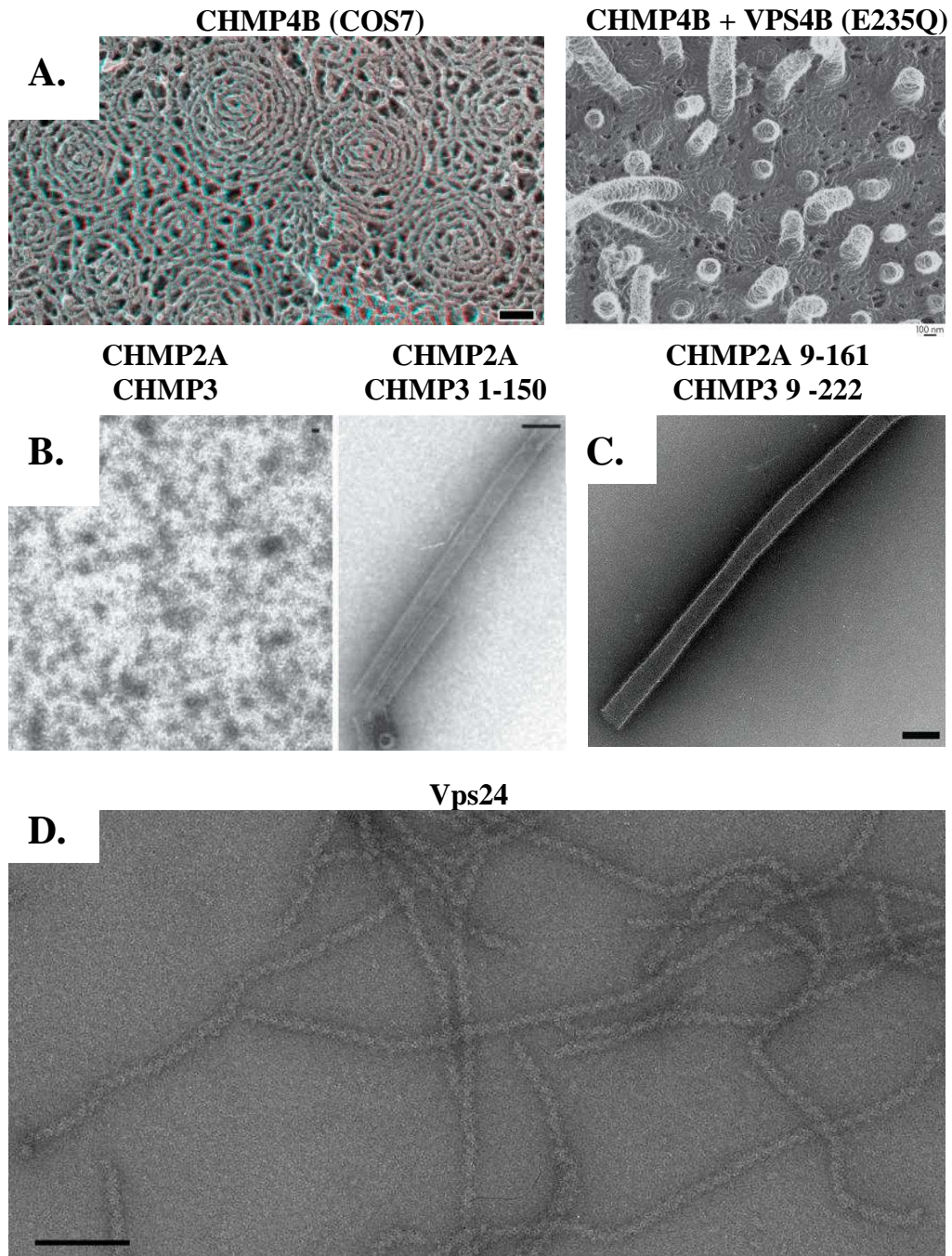


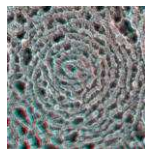
Figure 15 : les protéines CHMP peuvent polymériser in vitro sous plusieurs formes. Observations pas microscopie électronique. Echelle : 100 nm.

- A.** (Hanson et al., 2008) – **Deep-etch EM** - polymères de CHMP4 dans des cellules COS-7, après cotransfections de CHMP4 et une ATPase VPS4 déficiente en hydrolyse
- B.** (Bajorek et al., 2009) – tubes CHMP2-CHMP3 Δ C. L'utilisation de deux protéines non activées ne permet pas la formation de ces tubes (à gauche).
- C.** (Lata et al., 2008) – tubes similaires obtenus à partir de CHMP2 Δ C-CHMP3
- D.** (Ghazi-Tabatabai, 2008) – hélices formées par Vps24 (levure). Ces structures n'ont pas pû être reproduites avec CHMP3.

6.4 Polymérisation, Constriction puis Scission

Le consensus général est que ces polymères, ainsi que les différents empilements cristallins, puissent mettre en évidence certaines des propriétés physiques de ces protéines CHMP (Lenz et al., 2009 ; Bajorek et al., 2009 ; Fabrikant et al., 2010, Peel et al., 2011). Dans le cas des tubes CHMP2A-CHMP3 (Lata et al., 2008 ; Bajorek et al., 2009), une activation préalable de l'une ou l'autre des protéines est nécessaire à l'apparition des tubes. En revanche, les structures formées *in vitro* par CHMP4 (Hanson et al., 2008 ; Pires et al., 2009) ne semblent pas nécessiter d'activation préalable : il semblerait donc que l'activation des protéines CHMP, donc la suppression de l'interface $\alpha 2$ - $\alpha 5$, démasque en partie des surfaces importantes pour ces polymérisations, mais qu'elle puisse selon les polymères considérés avoir un rôle moins significatif et/ou être compensée par une concentration locale plus importante.

Les données cristallographiques des protéines CHMP (Bajorek et al., 2009), ainsi que les reconstitutions EM des homo- (Ghazi-Tabatabai et al., 2008) et hétéropolymères (Lata et al., 2008b) suggèrent que les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (et non $\alpha 5$ - $\alpha 6$) soient impliquées dans ces assemblages. De plus, une construction de CHMP4 ne possédant rien d'autre que les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (Hanson et al., 2008), et n'interagissant pas avec VPS4, peut également former ces polymères au niveau de la membrane plasmique.

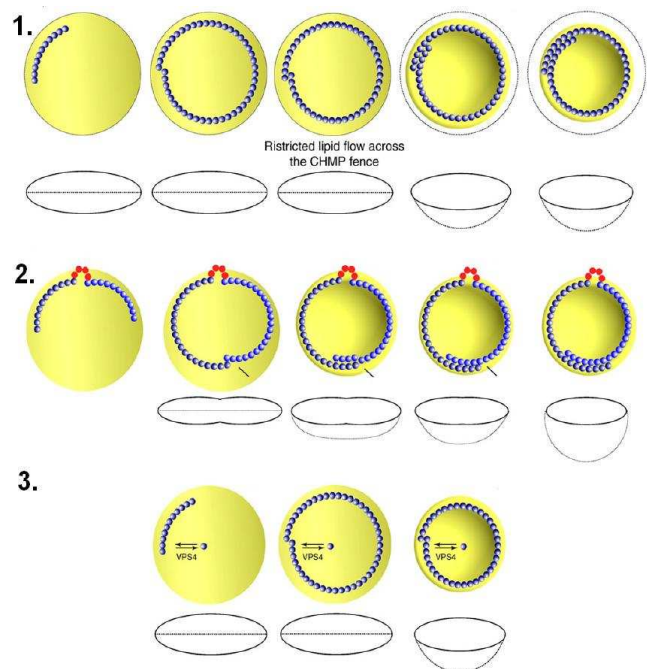


CHMP4

Figure 16 : trois modèles de constriction en spirales par CHMP4/Snf7 ont été proposé (Peel et al., 2011).

La formation d'une barrière physique entraîne une diminution locale de la fluidité membranaire. La diminution du diamètre serait induite par l'agencement en spirales.

1. Un seul filament de CHMP4 est nucléé au point de bourgeonnement.
2. Deux filaments sont nucléés.
3. L'action de VPS4 entraîne une constriction du polymère.



En utilisant les GUVs comme modèle, et d'après les expériences chez la levure (Wollert et al., 2009 ; 2010), il a été montré que Snf7 pouvait, in vitro, seul prendre en charge le phénomène de scission. Dans ce modèle minimal, Snf7 formerait une spirale au niveau du point de bourgeonnement initié in vivo par ESCRT-I/ESCRT-II. Snf7 serait donc responsable de la constriction (rétrécissement du diamètre) du cou de la vésicule.

Dans un premier modèle (voir figure 16), la constriction serait ainsi provoquée par une diminution de la fluidité membranaire dans la zone délimitée par le, ou les, polymère(s). La polymérisation de Snf7/CHMP4 aurait donc potentiellement deux fonctions : délimiter le cou de la vésicule, mais aussi son diamètre (et donc indirectement la taille de la vésicule). Chez la levure, des données récentes (Teis et al., 2010) suggèrent qu'ESCRT-II serait un point de nucléation de deux polymères Snf7, et que la suppression d'un de ces points induirait un défaut chez la levure. **Un second modèle** a donc été proposé où cette constriction serait induite par le mésappariement de deux polymères Snf7 plutôt qu'un : ce mésappariement s'apparenterait ici à un glissement d'un filament sur l'autre, ce qui entraînerait le remodelage. Enfin, un troisième modèle propose un couplage entre la polymérisation de Snf7 et l'activation de l'ATPase Vps4 : ici, Vps4 serait impliquée dans la diminution progressive du diamètre du polymère et donc la constriction. Ce dernier modèle est donc bien distinct des deux autres, en cela qu'il propose un rôle **actif et direct** de Vps4 dans le processus de scission.

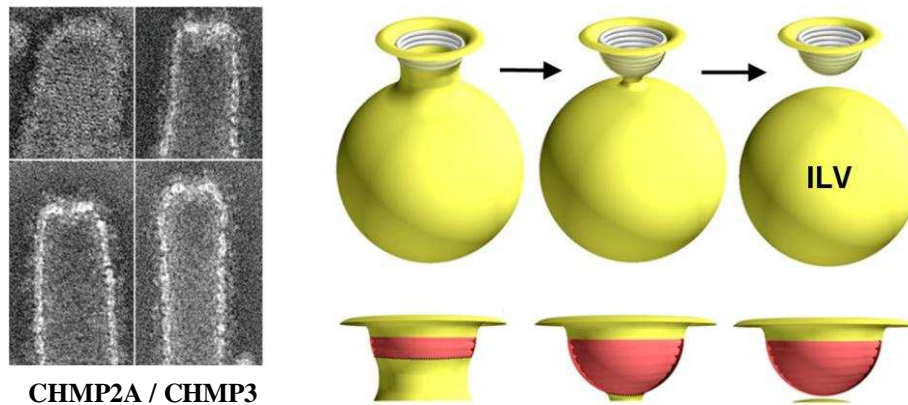


Figure 17: un modèle de scission membranaire par les tubes CHMP2A/CHMP3 a été proposé. (d'après Fabrikant et al., 2010 ; Peel et al., 2011)

CHMP2A et CHMP3 vont être recrutés au niveau du cou de la vésicule naissante où ils vont polymériser en dômes. Au fur et à mesure de sa progression, la surface externe du polymère impose à la membrane une réduction du diamètre du cou jusqu'à 3nm. A ce stade, l'état post-fission devient énergétiquement favorable et la vésicule se forme.

Sur la base de la première structure cristallographique de CHMP3 (Muziol et al., 2006), les auteurs suggèrent qu'une interface basique puisse médier des interactions entre les protéines CHMP et la membrane au niveau de $\alpha 1$, donc en n-terminal de la protéine. La structure en épingle à cheveux formée par les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ serait, de fait, impliquée à la fois dans la polymérisation et dans des interactions avec les lipides. A partir de la structure de l'hétéropolymère CHMP2A-CHMP3 (Lata et al., 2008b), cette surface se situerait à l'extérieur du tube.

Les tubes CHMP2A-CHMP3 peuvent se former en l'absence de membrane ou de liposomes : ils sont produits seulement en mélangeant les fractions **monomériques** de chaque protéine, dont au moins une doit être activée. Compte tenu du diamètre des tubes, il a donc été proposé (Fabrikant et al., 2009) que ces structures puissent se former à la base de la vésicule naissante, dans des conditions physiologiques au niveau d'un cou préformé et d'environ 50 nm de diamètre. Des modèles physiques ont été proposés pour expliquer un remodelage membranaire (Lenz et al., 2009 ; Fabrikant et al., 2009) par ces structures. Les polymères CHMP2-CHMP3 formeraient ainsi un dôme en contraignant la membrane jusqu'à atteindre un diamètre d'environ 3nm. A ce stade, l'état post-fission serait thermodynamiquement favorisé, car de plus faible énergie. **(voir figure 17)**

Ici, la modélisation considère un cas où VPS4 jouerait plutôt un rôle accessoire et/ou indirect. Paradoxalement, des tubes préformés sont capables de recruter VPS4 à leur centre, et l'ajout d'ATP dépolymérise l'ensemble du complexe (Lata et al., 2008b), suggérant plutôt un rôle direct.

Se pose la question du rôle de VPS4 in vivo dans le processus de remodelage membranaire. Et donc de comprendre si, in vivo, VPS4 pourrait participer à la structure et/ou la fonction même des polymères ESCRT.

6.5 Des modèles détaillés, mais contradictoires, d'ESCRT-III

Bien que les données relatives à la structure et à la fonction des complexes ESCRT-III se soient très largement précisées au cours des dernières années, il est à ce jour **difficile de proposer un modèle unique de ce remodelage**. En effet, les données fonctionnelles obtenues in vitro chez la levure sont **contradictoires** avec le rôle supposé de CHMP2 et CHMP3 chez les mammifères. Pour Wollert, la scission par ESCRT-III chez la levure est accomplie par la polymérisation de Snf7 (homologue de CHMP4) et les polymères formés par d'autres protéines CHMP ne sont pas concernés par ce mécanisme. Au contraire, les auteurs ne considèrent Vps2/CHMP2 et Vps24/CHMP3 que sous leur forme monomérique.

Les expériences in vitro sur les GUVs (Wollert et al., 2009 ; 2010) nécessitent **seulement l'activation de Snf7 par Vps20**. Dans ce contexte, Vps24/CHMP3 et Vps2/CHMP2 viendraient coiffer le polymère Snf7 à posteriori, puis recruter Vps4. Cette première expérience suggère que Vps4 n'aurait, chez la levure, **qu'un rôle de recyclage** des complexes ESCRT préformés. De fait, les auteurs n'attribuent aucun rôle à Vps4 dans la scission.

Ce modèle est en contradiction avec d'autres observations. Hanson (Hanson et al., 2009) montre que l'émergence des protrusions en cellules COS-7 est dépendante de l'effet dominant-négatif d'un

mutant de VPS4, ce qui suggère plutôt un rôle direct de cet enzyme dans le processus de tubulation. Par ailleurs le contenu de ces protrusions n'a pas été identifié, et les seuls polymères présentant un aspect tubulaire (et capables d'être dépolymérisés par VPS4) sont ceux formés par CHMP2-CHMP3 (Lata et al., 2008). Dans le modèle de Fabrikant, il est d'abord discuté un phénomène de scission VPS4-indépendant. Toutefois les auteurs n'excluent pas que VPS4 puisse aussi jouer un rôle dans le maintien de la structure en dôme décrite précédemment. En considérant que la rigidité de cette structure soit similaire à celle de la membrane elle-même, VPS4 pourrait donc stabiliser la forme cônique dans un premier temps, puis favoriser le passage vers l'état « post-fission » en induisant un changement conformationnel.

Ces deux modèles (voir figure 18) considèrent toutefois la formation des ILVs comme un **mécanisme de scission médié exclusivement par protéine**. Or, le rôle de microdomaines enrichis en certains lipides n'est pas à ce jour clairement défini : dans la mesure où les protéines ESCRT localisent seulement au niveau du cou de la vésicule, elles ne forment pas de manteau (ou « coat ») contrairement à d'autres modèles de bourgeonnement comme la clathrine. Cependant, les complexes ESCRT présentent une affinité particulière pour certains phosphoinositides, tels que le PI3P ou le PI3,5P. La composition lipidique des vésicules intraluménales n'est pas connue précisément, et la plupart des expériences *in vitro* n'ont jusqu'à présent pas considéré cet aspect comme une variable. Il est donc possible que ces espèces soient enrichies au niveau des points de bourgeonnement, et que cet aspect du bourgeonnement ait été négligé dans la reconstitution *in vitro* de ces phénomènes : de fait, le bourgeonnement ESCRT-dépendant serait potentiellement, au moins en partie, **aussi médié par les lipides eux-mêmes** (Hurley et al., 2010).

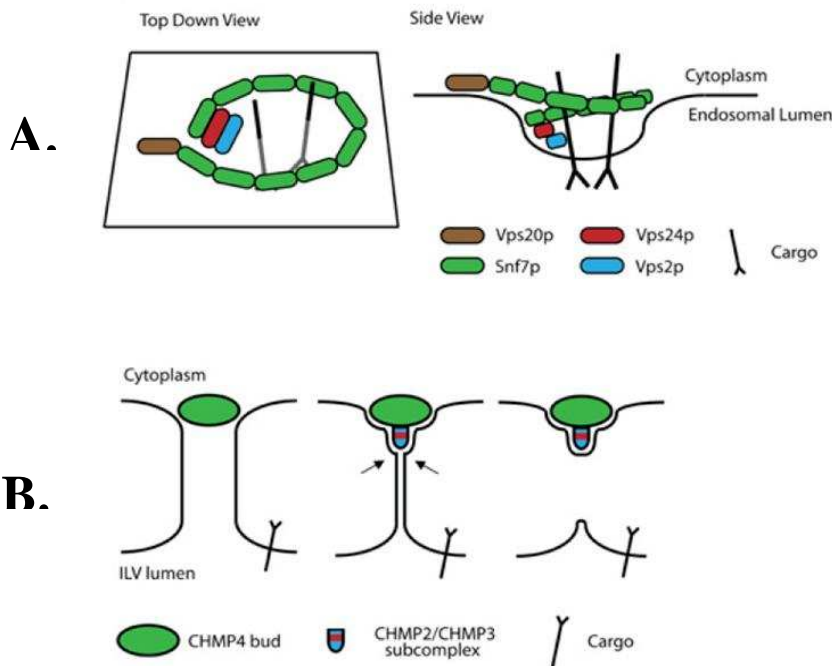


Figure 18 : deux modèles différents, mais contradictoires de scission par ESCRT-III (Carlton et al., 2010)

A. Le modèle « CHMP4-seul », déterminé pour les protéines ESCRT-III chez la levure, ne considère que la polymérisation de Snf7/CHMP4.

B. Le modèle « en dôme » considère un premier polymère CHMP4, suivi d'un sous-complexe CHMP2-CHMP3 venant terminer la scission.

7. Le complexe VPS4-VTA1

7.5 Structure de Vps4

VPS4 appartient à la grande famille des AAA+-ATPases. On retrouve deux isoformes chez les mammifères, VPS4A et VPS4B, mais un seul chez la levure. Aucune différence fonctionnelle n'a pu être identifiée pour les deux isoformes de VPS4 chez l'homme : **il est donc possible que leurs fonctions soient, au moins en partie, redondantes.**

Brièvement, Vps4 est composée d'un domaine MIT en n-terminal, composé de trois hélices α , capable d'interagir avec les **motifs MIM1 (CHMP2/CHMP3) et MIM2 (CHMP4/CHMP6)** présents en c-terminal des protéines CHMP. Ce domaine MIT a une double fonction : il est responsable du recrutement de VPS4 par le complexe ESCRT-III, et il régule négativement son activité ATPasique. (Merril et al. 2010) ; les motifs MIM1 et MIM2 interagissent avec le domaine MIT par deux surfaces distinctes. De fait, un domaine MIT peut interagir simultanément avec un motif MIM1 et un MIM2. Par ailleurs il a été montré que l'activité ATPasique de VPS4 pouvait être stimulée par la présence des motifs MIM isolés (Azmi et al., 2006 ; Merrill et al., 2010), **ce qui suggère une activation de l'enzyme et/ou une oligomérisation au contact des protéines CHMP et en présence d'ATP (voir figure 19).**

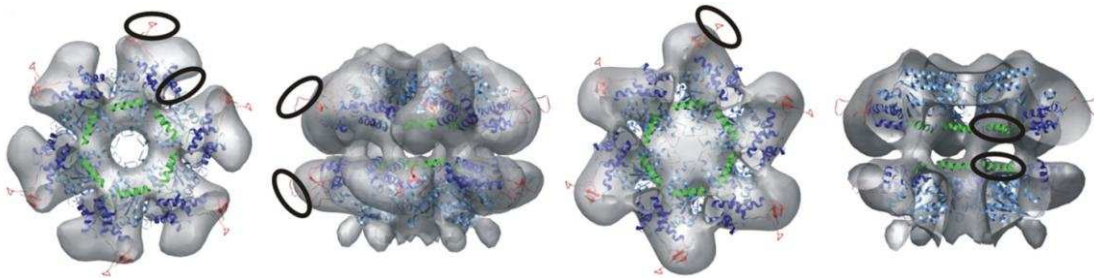
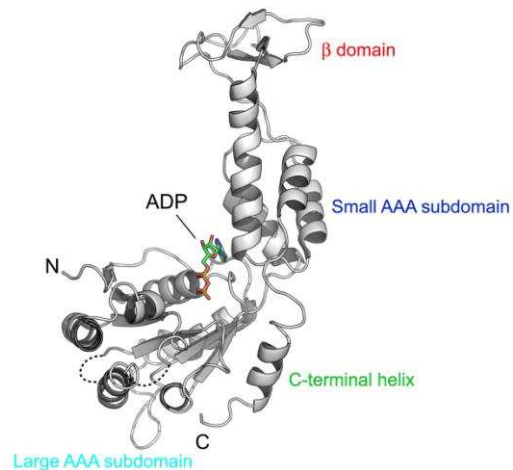


Figure 19: Structure de Vps4

Reconstitution du dodécamère Vps4^{E233Q} en présence d'ATP à 25Å. (d'après Landsberg et al., 2009)

Quatre vues différentes du modèle.

Le modèle de hVps4^{ΔMIT} (PDB : 1XW1) est placé dans la densité. Les régions du modèle qui dépassent sont entourées en noir. Le code couleur est identique à celui du monomère Vps4 chez la levure (Xiao et al., 2007 ; voir ci-contre)



Vps4 présente encore deux sous-domaines AAA+ responsables de son activité. En outre, elle présente un domaine β et une hélice α c-terminale potentiellement impliqués dans la dimérisation. **La stochiométrie de l'oligomère VPS4 est toujours sujette à controverses.** En l'absence d'ATP Vps4 forme un dimère stable en solution (Gonciarz et al., 2008 ; Yu et al., 2008 ; Landsberg, 2009), et l'homologue humain VPS4B présente un équilibre monomère-dimère (Azmi et al., 2006). Les structures du monomère ont été résolues chez l'homme et la levure (Scott et al., 2005; Xiao et al., 2007) ; en revanche, la structure de Vps4 sous sa forme oligomérique est inconnue. En incubant un mutant Vps4^{E233Q} (pouvant lier mais pas hydrolyser l'ATP) avec son substrat (Babst et al., 1998 ; Azmi et al., 2006 ; Landsberg et al., 2009), on observe une oligomérisation de la protéine et la formation d'un dodécamère (Landsberg et al., 2009) : d'après cette dernière reconstruction par cryo-EM, la structure serait formée par la superposition de deux hexamères. **Cette structure conduit à la formation d'un pore central**, d'environ 30Å de diamètre, et fermé à l'une de ses extrémités par une densité non identifiée. Les deux anneaux semblent exercer une rotation d'environ 8° par rapport à l'axe central de la reconstruction : cette observation est consistante avec un mécanisme de cliquet (ou « ratchet »), où la rotation d'un anneau induite par l'hydrolyse de l'ATP entraîne la rotation du second. Le complexe VPS4 ainsi formé s'associerait à ESCRT-III par ses domaines MIT, **puis induirait leur dissociation de la membrane** à travers plusieurs changements conformationnels (Babst et al., 1998, 2002; Scott et al., 2005; Stuchell-Brereton et al., 2007; Vajjhala et al., 2007; Yeo et al., 2003).

7.2 Les protéines associées à Vps4 : rôle de VTA1, CHMP1 et IST1

Il a été montré que les protéines VTA1, CHMP1/Did2 et IST1 pouvaient interagir avec VPS4, et que ces interactions étaient conservées chez la levure et l'homme (Lottridge et al., 2006 ; Dimaano et al., 2008). Des structures partielles de Vta1 (Xiao et al., 2008 ; Yang et al., 2010) et Ist1 (Rue et al., 2008 ; Xiao et al., 2009 ; Bajorek et al., 2009) sont disponibles. Ist1 adopte un repliement similaire à celui des protéines CHMP, mais avec la particularité de posséder à la fois un domaine MIM1 et un domaine MIM2. Vta1 présente une architecture plus spécifique et forme des dimères en solution. Elle présente en outre deux domaines MIT capables de recruter spécifiquement CHMP1/Did2 et Ist1.

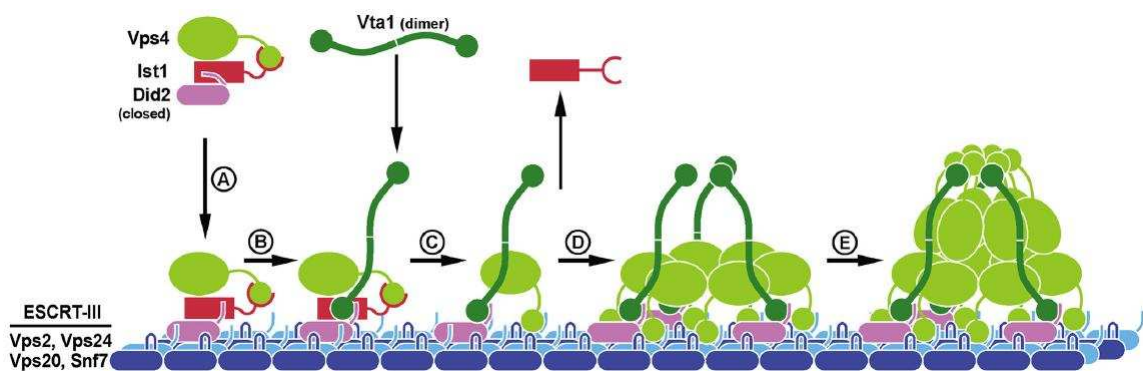


Figure 20: modèle d'assemblage de Vps4 (d'après Shestakova et al., 2010).

Shestakova propose un modèle d'assemblage séquentiel de Vps4, et un rôle de régulation pour Ist1. Vta1 faciliterait l'assemblage en dodécamères, en recrutant un second hexamère par ses domaines MIT. Cet assemblage est directement stimulé par la présence du polymère ESCRT-III.

A partir de données in vivo sur la levure, un modèle élaboré de l'assemblage de Vps4 sur ESCRT-III a été proposé (Shestakova et al., 2010 ; Babst et al., 2011). Dans ce modèle, **Ist1 maintiendrait Vps4 sous forme inactive dans le cytosol**. Au contraire, le dimère **Vta1 favoriserait l'assemblage de Vps4 en dodécamères et la transition vers la forme active**. (voir figure 20).

7.3 Une carte d'interactions complexe

Il est évident que les derniers modèles relatifs à ESCRT ont atteint un niveau de complexité important, puisqu'ils font intervenir notamment chez les mammifères plus d'une vingtaine de protéines différentes (en comptant les isoformes). La carte d'interactions qui émerge est d'autant plus difficile à hiérarchiser que certaines de ces interactions varient selon les constructions utilisées, ce qui est consistant avec le principe d'autoinhibition (e.g., Lata et al., 2008; Lin et al., 2005; Shim et al., 2007). En outre, compte tenu de la diversité des fonctions cellulaires associées à ESCRT, il faut également tenir compte de la redondance de certains isoformes et/ou de l'implication plus spécifique d'un isoforme dans un processus donné. Enfin, les aspects séquentiels de la mise en place d'ESCRT sont encore à considérer, notamment les paramètres cinétiques relatifs à ces interactions protéine-protéine ainsi que leurs affinités respectives.

A ce titre, de nouveaux modèles d'étude commencent à apporter des informations essentielles à la mise en place d'ESCRT dans un cadre plus in vivo et fonctionnel : dans le prochain chapitre, j'aborderai donc ces nouvelles fonctions émergentes des protéines ESCRT.

8. Les fonctions émergentes d'ESCRT

8.1 Le bourgeonnement des virus enveloppés

8.1.1 Généralités sur le cycle viral

La catégorie des virus enveloppés (HIV, Virus Influenza...) regroupe plusieurs sous-ensembles de virus à ARN, ADN et rétrovirus. On distingue communément six grandes étapes dans le cycle viral des virus enveloppés : la **fixation** du virus à la cellule, l'**entrée**, la **décapsidation**, la **réplication**, l'**assemblage**, puis le **bourgeonnement**. Cette dernière étape diffère des virus non-enveloppés où la sortie du virus est induite par lyse cellulaire. Au cours du bourgeonnement, la particule virale acquiert son enveloppe : la capsid va donc devoir se couvrir (ou s' « envelopper ») d'une membrane puis se détacher de cette dernière pour être libérée dans le milieu extracellulaire. Le bourgeonnement final se produit au niveau de la membrane plasmique ; en revanche, les virus enveloppés ne vont pas tous transiter par les mêmes compartiments. (voir figure 21)

Les virus Herpes, par exemple, vont fusionner au préalable avec la membrane du transgolgi (Johnson DC, Baines JD, 2011), puis être sécrétés dans un second temps au niveau de la membrane plasmique. Pour les virus HIV-1 et Influenza, en revanche, l'assemblage de la capsid et le bourgeonnement se font directement depuis la membrane plasmique au niveau de radeaux lipidiques. En cela, ce processus de bourgeonnement est topologiquement similaire à celui observé pour la formation des vésicules intraluminales dans la voie des corps multivésiculés. Dans le cas d'Influenza (Yondola M, Carter C. et al., 2011 ; Chazal N, Gerlier D, 2003), cet assemblage est médié par l'interaction des protéines transmembranaires hémagglutinine (HA) et neuraminidase (NA) . HA recrute entre autres la

protéine M1, qui va elle-même recruter la protéine M2. Très récemment, Rossman (Rossman et al., 2010) a proposé que M2 seule pouvait déformer la membrane plasmique. In vitro, M2 est capable de déformer des GUVs seules en s'incorporant dans des vésicules intraluminales. De plus, la surexpression de M2 dans des cellules 293T induit la production de pseudoparticules virales dans le milieu. Le rôle in vivo de la machinerie ESCRT dans le processus de bourgeonnement du virus Influenza a été longtemps discuté : in vitro, une interaction entre M1 et VPS28 a même été rapportée (Bruce et al., 2009), en revanche aucune colocalisation in vivo n'a pu être mise en évidence dans le cadre d'un phénomène de bourgeonnement. Bien que l'interaction entre Influenza et la machinerie ESCRT suggère un rôle de cette dernière dans le cycle de réplication du virus, le bourgeonnement des particules virales est lui-même ESCRT-indépendant. De fait, le récent rôle attribué à M2 semble d'autant plus pertinent.

Influenza pourrait donc devenir, à l'avenir, un modèle de choix pour l'étude générale des bourgeonnements ESCRT-indépendants.

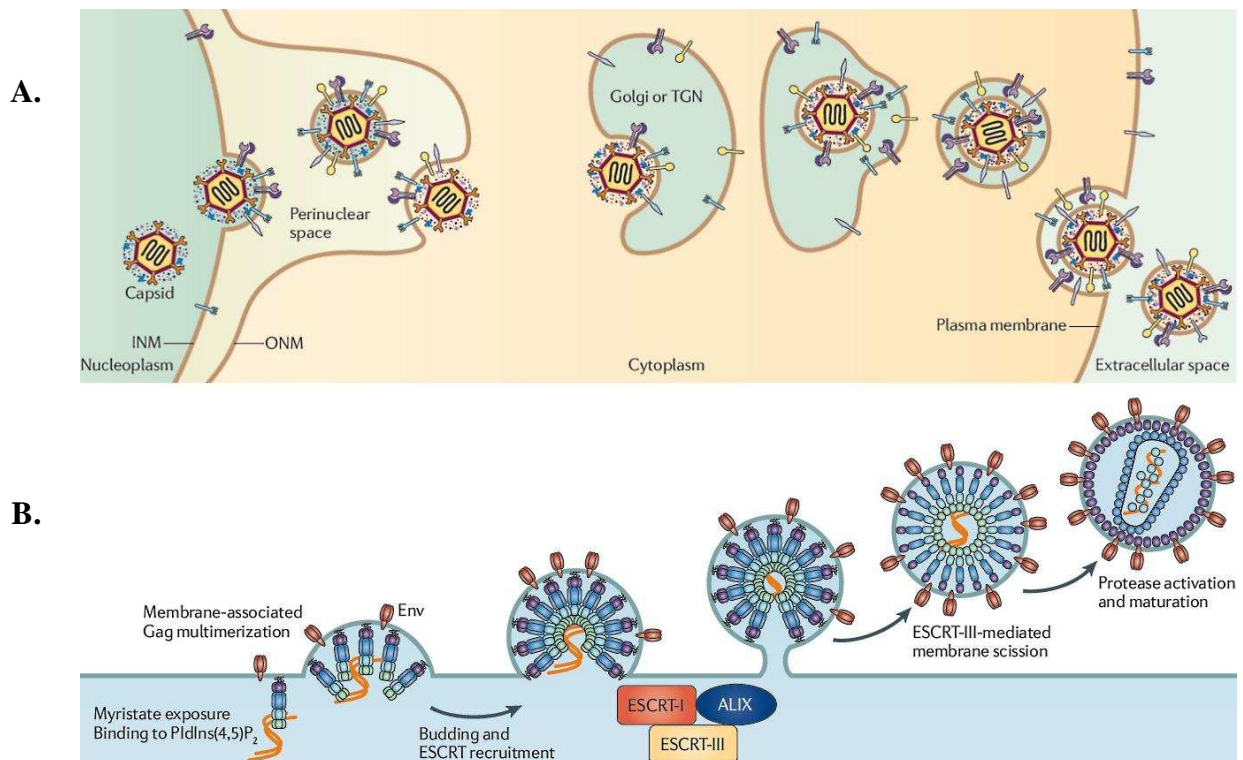


Figure 21 : adapté de Martin-Serrano J, Neil SJ., 2011; Johnson DC, Baines JD., 2011.

A. Association et Bourgeonnement sont assurés dans deux compartiments distincts chez le virus Herpes Simplex.

Une fois la capside assemblée dans le noyau, elle subit deux cycles d'enveloppement, dans l'espace périnucléaire d'abord, puis dans le trans-golgi, avant de fusionner avec la membrane plasmique.

B. Association et Bourgeonnement sont tous deux assurés au niveau de la membrane plasmique chez HIV-1

La polyprotéine gag polymérise et s'associe à la membrane plasmique. La partie c-terminale recrute les facteurs endogènes ESCRT pour finaliser l'étape de bourgeonnement et le détachement de la particule.

Le cas du bourgeonnement du VIH-1 est en revanche plus clair vis-à-vis de la machinerie ESCRT (Weiss ER, Göttlinger H., 2011). Ici, l'assemblage et le bourgeonnement du virus sont médiés par la polymérisation de la polyprotéine virale gag. Entre autres, il a été montré que la protéine p6 (en c-terminal de gag) interagissait avec certains composants ou partenaires de la machinerie ESCRT, et que ces interactions étaient nécessaires au bourgeonnement à un stade tardif (VerPlank, 2001 ; Garrus, 2001 ; Martin-Serrano, 2001 ; Demirov, 2002 ; Zamborlini et al., 2006). La mutation de certains motifs riches en proline présents dans p6 (en particulier le motif PTAP) conduit à un défaut tardif de bourgeonnement : selon les types cellulaires infectés, les virions restent alors maintenus à la membrane plasmique par une fine zone membranaire (Gottlinger et al., 1991) ou encore forment des chaînes de virions aberrantes dans le milieu (Demirov et al., 2002). Cette donnée suggère donc que l'étape de détachement du virion n'est pas un phénomène spontané.

Pour cette raison, ces domaines sont définis comme « tardifs ». Ils sont impliqués dans de multiples interactions protéine-protéine qui seront abordées en détail dans un chapitre séparé.

8.1.2. Les bourgeonnements ESCRT-dépendants (cas du virus VIH)

Dans le cas du bourgeonnement du virus VIH, c'est l'accumulation de la protéine gag au niveau de la membrane plasmique qui va marquer la formation du virion. L'interaction entre TSG101 et le **motif tardif PTAP** de p6 a très tôt suggéré un rôle d'ESCRT dans le processus de bourgeonnement. De même, la surexpression d'un mutant dominant-négatif de l'ATPase VPS4 perturbe la voie des corps multivésiculés et bloque le bourgeonnement du HIV (Garrus et al., 2001). (**voir également figure 22**)

Enfin, les protéines CHMP constituant ESCRT-III (Zamborlini et al., 2006) peuvent également, sous certaines conditions, exercer un phénomène de dominance-négative. Dans ce dernier cas, la surexpression de protéines CHMP marquées par une étiquette volumineuse (type GFP), ou encore tronquées en C-terminal, conduit à une diminution importante de virions produits dans les cellules 293T. De fait, les complexes ESCRT-I, ESCRT-III et VPS4 sont impliqués dans ce bourgeonnement. Une autre protéine, Alix, a également été impliquée et interagit avec p6 par le **motif tardif LXXLF** (Strack et al., 2003 ; Fisher et al., 2007 ; Lee et al., 2007). Il a été montré que le **recrutement d'Alix** par la protéine gag était également crucial dans le processus de bourgeonnement (Martin-Serrano et al., 2003), et que cette protéine accessoire jouait un **rôle d'adaptateur entre ESCRT-I et CHMP4**. A contrario, ESCRT-II et CHMP6 ne sont pas impliqués dans ce bourgeonnement (Langelier et al., 2006), alors qu'ils sont absolument nécessaires pour la génèse des corps multivésiculés : une explication simple est donc qu'Alix jouerait à la fois le rôle d'ESCRT-II et CHMP6 chez HIV-1. En revanche Alix semble dispensable à la formation des ILVs (Doyotte et al., 2008) ; à contrario, un homologue proche (HD-PTP/PTPN23) pourrait jouer ce rôle.

Ces différences suggèrent qu'il existe en réalité plusieurs modes de recrutement possibles d'ESCRT-III, et que **tous les processus ESCRT-dépendants ne sont pas strictement équivalents**. Le bourgeonnement du virus VIH-1 présente notamment des spécificités remarquables par rapport au modèle de formation des ILVs médié par ESCRT chez la levure. En revanche, la dynamique précise d'assemblage de HIV-1 au niveau de la membrane plasmique (en particulier le recrutement d'ESCRT-III) s'est révélée difficile à déterminer par les méthodes conventionnelles (Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD, 2011). Très récemment (Baumgärtel et al., 2011 ; Jouvenet et al., 2011), deux équipes sont parvenues à suivre l'assemblage de ces virions en temps réel.

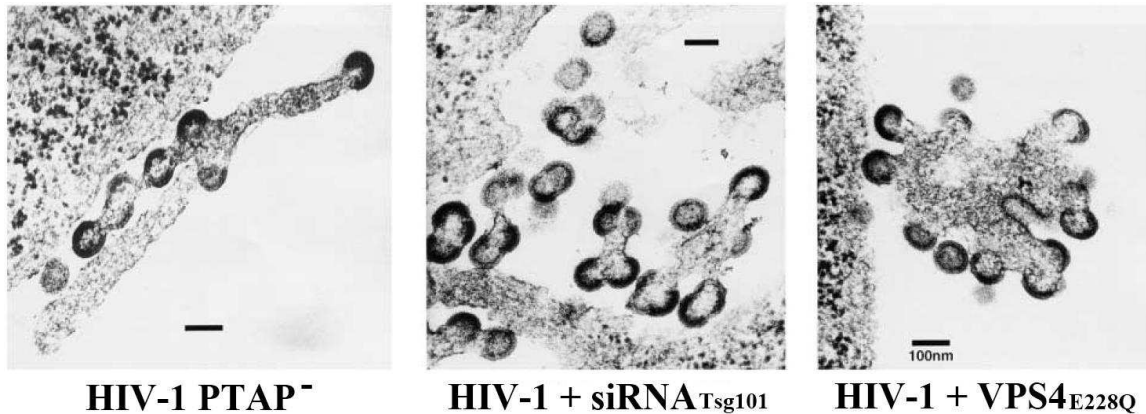


Figure 22: adapté de Garrus et al., 2001. Virions bloqués à un stade tardif – observations par microscopie électronique – échelle 100 nm
 L'impossibilité pour les virions de recruter une machinerie ESCRT fonctionnelle se traduit par un défaut tardif dans la phase de bourgeonnement, ce qui montre un rôle actif d'ESCRT dans cette dernière étape.

Ces deux travaux mettent en évidence le recrutement de VPS4 au point de bourgeonnement. L'équipe de Baumgärtel suggère en outre que VPS4, sous forme monomérique ou dimérique dans le cytosol, puisse oligomériser au niveau des VLPs (particules virales). Un des points remarquables soulevé par ces deux travaux est l'accumulation rapide d'un ou plusieurs dodécamères Vps4 **en un « burst »**, au moment du détachement de la VLP, **voire en amont** : cette donnée suggère que l'assemblage ESCRT-dépendant soit très transitoire, de l'ordre de quelques dizaines de secondes, à comparer à la dizaine de minutes requises pour le processus de bourgeonnement au complet. En outre, Jouvenet et al. montrent qu'en surexprimant un mutant dominant-négatif de VPS4, on bloque non seulement la libération des virions, mais on observe aussi un nombre croissant de complexes ESCRT associés aux VLPs, ce qui suggère fortement un rôle actif de VPS4 dans le mécanisme de scission.

Les auteurs se sont également attachés à suivre l'accumulation de la protéine gag au niveau des zones d'assemblage : il apparaît que la protéine gag s'accumule en une dizaine de minutes indépendamment de la machinerie ESCRT. Chez le virus EIAV, qui présente également un bourgeonnement ESCRT-dépendant, les auteurs observent une bonne corrélation entre l'accumulation de gag et celle d'ALIX : cette donnée est consistante avec un modèle où ALIX serait recruté par gag pour induire l'assemblage d'ESCRT-III indépendamment d'ESCRT-II. En effet, les auteurs observent après cet assemblage le recrutement des trois isoformes CHMP4 ainsi que de CHMP1B, suivi de VPS4. En outre, il apparaît dans les deux cas qu'ESCRT-III est recruté tardivement, et que cette accumulation est favorisée quand l'activité de VPS4 est diminuée (en utilisant le mutant dominant-négatif VPS4E228Q). Curieusement, les auteurs ne sont pas parvenus à retrouver l'accumulation d'ALIX au point de bourgeonnement du VIH, contrairement à ESCRT. **Il est possible que cette absence soit liée à une accumulation moins marquée de la protéine, peut-être en raison de différences d'affinité avec les domaines tardifs des deux virus.**

A ce jour, les conditions requises pour l'activation et/ou le recrutement d'ESCRT-III ne sont toujours pas définies. Une première hypothèse est que la concentration d'ALIX doit atteindre localement

un seuil critique pour recruter ESCRT. Un autre hypothèse est que des nouveaux paramètres tels que la courbure de la membrane plasmique jouent un rôle critique dans cet assemblage. Enfin, une troisième serait que des protéines non identifiées dans la présente expérience jouent ce rôle d'activation.

Il reste que l'implication des trois isoformes de CHMP4 dans le bourgeonnement du VIH n'est pas nouvelle. Notamment, il a été montré (Morita et al., 2011) que les trois isoformes (4A, 4B, 4C) sont impliqués dans ce processus : de fait, la déplétion individuelle de chacun de ces isoformes, en particulier CHMP4B, conduit à une inhibition de la libération des virions VIH. La codéplétion des trois isoformes entraîne en comparaison une inhibition bien supérieure (166 fois plus importante) que celle de CHMP4B seule (12 fois), ce qui suggère donc une certaine **redondance** entre leurs différentes fonctions. Toujours dans ce même papier, les auteurs observent un effet similaire avec CHMP2A et CHMP2B. En outre, ils mettent en évidence par pulldown que CHMP2 et CHMP4 interagissent directement, et que cette interaction semble requise pour le phénomène de bourgeonnement : cette première conclusion du papier est particulièrement intéressante, car elle va clairement à l'encontre du précédent modèle paru chez la levure où CHMP2 n'était recruté qu'après CHMP3, en suivant l'ordre préétabli 6>4>3>2. Ici, ces données suggèrent que, au moins dans le cas du VIH, **CHMP2 et CHMP4 peuvent former ensemble un complexe**. Plus surprenant encore, la déplétion de CHMP3 n'entraîne en comparaison des autres protéines CHMP qu'une inhibition modeste. De fait, une seconde conclusion du papier est que la polymérisation d'ESCRT au niveau des virions VIH **diffère sensiblement** des précédentes observations faites chez la levure, notamment pour CHMP3 qui semble ici accessoire.

Ces différences sont t'elles seulement dues à des contraintes expérimentales, ou dénotent t'elles un mode de polymérisation radicalement différent pour le VIH ? Au regard des récentes données biophysiques obtenues par la méthode des GUVs, ces questions semblent donc de première importance.

8.1.3 Les domaines tardifs

Les motifs tardifs sont retrouvés chez toutes les familles de rétrovirus ainsi que de nombreux virus enveloppés (Weiss ER, Göttlinger H., 2011 ; Juan Martin-Serrano and Stuart J. D. Neil, 2011). Bien que tous ne présentent pas un bourgeonnement ESCRT-dépendant (en particulier le virus Influenza, voir plus haut), le virus HIV-1 a longtemps servi de modèle in vivo pour le recrutement de la machinerie ESCRT. Chez HIV-1, le motif **P(S/T)AP** a été le premier caractérisé (Gottlinger et al., 1991) et interagit avec Tsg101. Les études faites sur HIV-1 et EIAV ont en outre mis en évidence au moins deux autres motifs tardifs, à savoir le motif **LYPXnL** présent entre autres chez HIV-1 et EIAV, et le motif **PPXY**, non retrouvé chez HIV-1. Ces trois motifs vont chacun recruter la machinerie ESCRT par des voies différentes, et avec une affinité variable. (voir figure 23)

Le motif PTAP est porté par la protéine p6 chez HIV-1 et interagit avec Tsg101 avec une affinité de 50 μ M (Pornillos et al., 2002). Cette affinité est supérieure à celle du motif PSAP présent chez Hrs selon un facteur 6 (290 μ M), bien que les deux motifs interagissent d'une façon similaire avec le domaine UEV de Tsg101 (Im et al., 2010). Il s'agit donc d'un cas intéressant où une protéine virale va rentrer en compétition avec des motifs endogènes pour recruter la machinerie de l'hôte. Le recrutement de Tsg101 par ce motif PTAP explique donc la dépendance entre le bourgeonnement du virion et le complexe

ESCRT-I. En revanche, (Martin-Serrano et al., 2003) aucun lien direct n'a été retrouvé chez HIV entre PTAP et ESCRT-III. Ce lien pourrait être apporté par un second domaine tardif, **LYPXnL**, susceptible de lier la protéine Alix. En effet, cette dernière interagit à la fois avec ESCRT-I (par le biais de Tsg101) et ESCRT-III, par le biais de CHMP4 (Usami et al., 2007 ; Lee et al., 2007 ; Fisher et al., 2007). Il a encore été proposé qu'Alix puisse dimériser en solution, tout en maintenant sa capacité à recruter le motif LYPXnL in vitro (Pires et al. 2009) ; en revanche le contexte physiologique de ces interactions reste à éclaircir dans un modèle in vivo.

Un troisième motif, **PPXY**, rencontré (Freed et al., 2002) chez certains virus enveloppés tels que le virus MLV ou Ebola, n'est en revanche pas retrouvé chez VIH. Ce motif va recruter des ubiquitine ligases HECT de la famille NEDD4 (Martin-Serrano et al., 2005) en se liant à leurs domaines WW (Martin-Serrano et al., 2005). Bien que HIV-1 ne possède pas ce motif, il a été rapporté (Chung et al., 2008 ; Usami et al., 2008) que la surexpression de NEDD4 pouvait également compléter une souche HIV ne possédant pas p6 : cette observation suggère donc que NEDD4 puisse être recrutée par d'autres motifs tardifs encore inconnus chez HIV. Le rôle exact de NEDD4 dans ce processus est en revanche mal défini : l'ubiquitination de certains facteurs pourrait cependant jouer un rôle indirect de **plateforme** par l'intermédiaire de protéines cargo (Weiss et al., 2010 ; Zhadina et al., 2010) ou de protéines associées aux Arrestines (ARTs) susceptibles d'interagir avec ESCRT-III (Rauch et al., 2011).

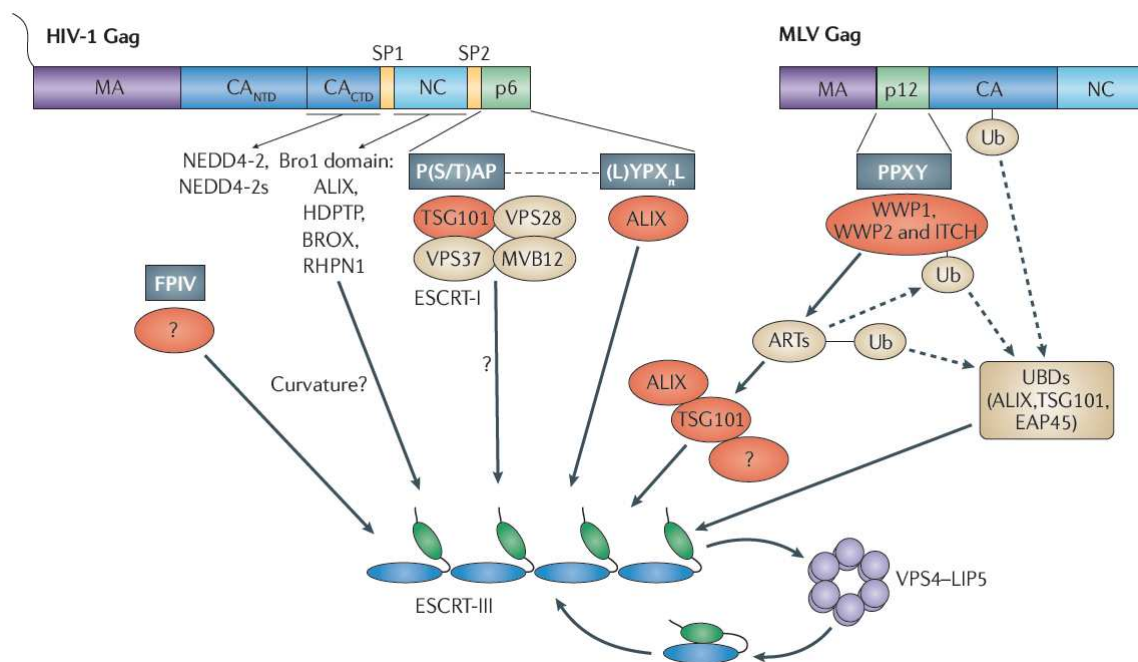


Figure 23 : Les domaines tardifs recrutent les protéines de l'hôte par des voies distinctes.
(adapté de Martin-Serrano J., Neil SJ., 2011)

8.2 La cytokinèse

8.2.1. Généralités sur la cytokinèse

L'étape de cytokinèse est définie comme l'étape de la mitose où la cellule mère va se séparer en deux cellules filles. Elle intervient en fin d'anaphase et au cours de la télophase : elle se caractérise par la formation d'un anneau contractile, puis du sillon de division (ou « cleavage furrow »), suivie enfin de la formation du corps intermédiaire, ou « midbody » (Barr FA, Gruneberg U, 2007 ; Steigemann P, Gerlich DW, 2009). La disparition du pont intercellulaire se produit en fin de télophase, au cours de l'abscission. La cytokinèse comprend donc plusieurs sous-étapes qu'on peut distinguer l'une de l'autre. Brièvement ; le sillon de division est formé par la contraction d'un anneau d'actine-myosine. Le pont intercellulaire est composé majoritairement d'un faisceau dense de microtubules, avec en son centre une zone dense appelée le corps intermédiaire : cette zone dense est constituée de nombreuses protéines associées aux microtubules ; il a été proposé que ce corps intermédiaire serve donc de plateforme pour certaines protéines régulatrices. Une question fondamentale concerne le rôle d'ESCRT dans cette étape (Morita et al., 2007 ; Carlton et al., 2007), puisqu'un certain nombre de ses composants ont été retrouvés au niveau du corps intermédiaire. Une hypothèse simple est donc qu'ESCRT, en raison de ses propriétés de scission, puisse médier l'étape d'abscission elle-même. (voir figure 24)

8.2.2 Une fonction conservée chez les archaébactéries

Les composants du système ESCRT sont retrouvés dans la plupart des embranchements du règne du vivant, et leur ancienneté préfigure la séparation entre organismes procaryotes et eucaryotes (Slater et al., 2006 ; Field et al., 2007 ; Makarova et al., 2010). L'étude récente de la machinerie ESCRT chez les archaébactéries a permis de mieux cerner comment ce système s'est diversifié au cours du temps pour englober de nouvelles fonctions. L'étude d'ESCRT chez les archaébactéries permet en outre de proposer un mécanisme intermédiaire, supposé plus simple, entre la levure et l'homme : des données récentes montrent en effet (Samson et al., 2011 ; Moriscot et al., 2011) que chez *Sulfolobus*, CdvA/CdvB/CdvC constituent une machinerie ESCRT divergente, mais simplifiée, impliquée dans la division cellulaire.

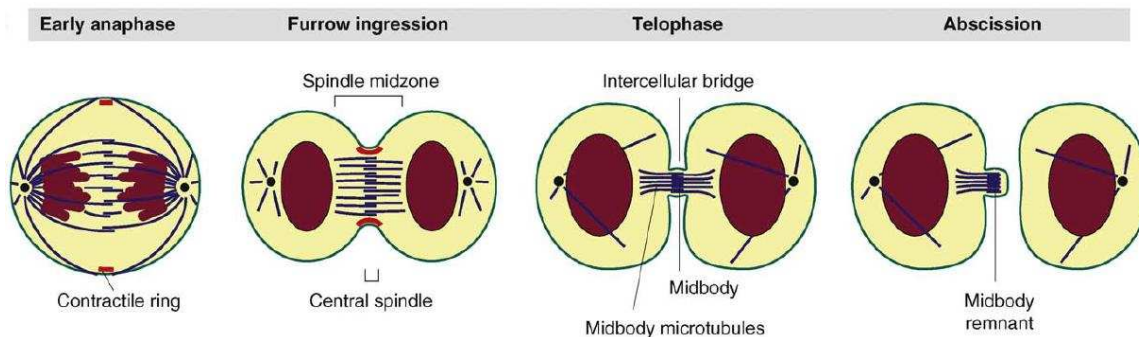


Figure 24 : d'après Steigemann, Gerlich, 2009.

La cytokinèse s'étend de l'anaphase à la télophase, et peut être décomposée en plusieurs étapes distinctes. Il a été récemment proposé un rôle d'ESCRT au niveau des centrosomes ainsi que l'étape d'abscission.

Le recrutement de la machinerie ESCRT chez les eucaryotes a également été mis en évidence au niveau du corps intermédiaire, pendant l'étape d'abscission (Carlton et al., 2008). Il a été montré que CEP55 colocalisait à ce niveau et recrutait ALIX (Morita et al., 2007) à partir de son domaine riche en proline. Le recrutement d'ALIX induit le recrutement d'ESCRT à distance du corps intermédiaire (voir figure). Cette interaction est consistante avec les données de la littérature dans d'autres modèles expérimentaux, puisque CEP55 est capable non seulement d'interagir avec elle-même, mais également avec TSG101 en reconnaissant un autre motif riche en proline. La suppression de l'axe CEP55/ALIX/CHMP4 conduit à un défaut dans la cytokinèse (Morita et al., 2007 ; Carlton et al., 2008), lié à un défaut dans le recrutement d'ESCRT-III.

Très récemment, deux papiers ont précisé le rôle potentiel d'ESCRT-III au niveau du corps intermédiaire *in vivo* (Guizetti et al, 2011 ; Elia et al., 2011). L'équipe de Guizetti (**voir figure 25**) est parvenue à reconstruire, à partir d'images de tomographie, un réseau de filaments transversaux **distinct du réseau longitudinal de microtubules**, à un stade tardif de l'abscission. Les auteurs notent la présence de filaments de 17 nm de diamètre qu'ils attribuent à la polymérisation d'ESCRT-III **sur la base de trois arguments** :

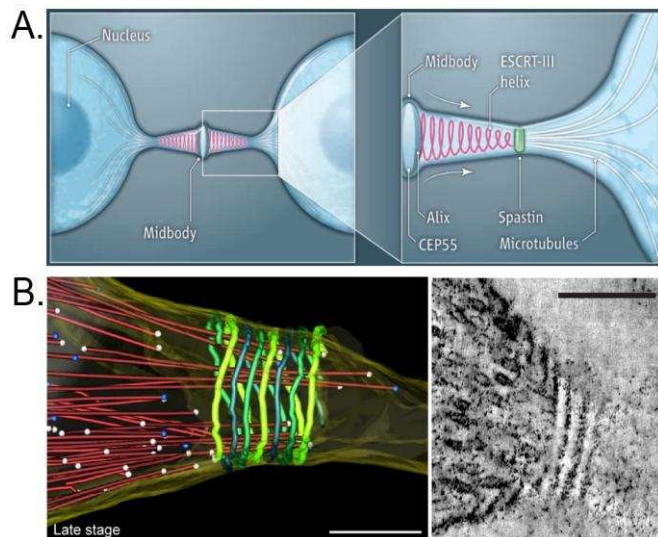


Figure 25: scission médiée par ESCRT - cas de la cytokinèse

A. D'après Raiborg, Stenmark, 2011. Modèle d'abscission médiée par ESCRT

CEP55 recrute Alix qui recrute à son tour ESCRT-III depuis le corps intermédiaire. SPASTIN clive les microtubules au niveau du pont intercellulaire, à distance du corps intermédiaire.

B. D'après Guizetti et al., 2011. Reconstruction des striations induites par ESCRT *in vivo*. Echelle : 200 nm

Par tomographie électronique, les auteurs reconstituent un réseau de filaments de 17 nm de diamètre induit par ESCRT.

les protéines ESCRT-III colocalisent au niveau du corps intermédiaire ; la déplétion de CHMP2A par siRNA inhibe la formation de ces structures ; enfin, les auteurs montrent que cette structure n'est pas dépendante du faisceau de microtubules et d'actine. Sur la base des propriétés physiques connues du complexe ESCRT-III, les auteurs proposent donc qu'ESCRT puisse jouer un rôle de constriction à un stade tardif de l'abscission. Morita (Morita et al, 2011) montre en outre, par des expériences de time-lapse, que l'action de VPS4 et de CHMP4B est nécessaire à l'abscission des cellules : outre la bonne corrélation entre ce résultat et celui de Guizetti, cette nouvelle observation suggère (comme pour le bourgeonnement du VIH) **que VPS4 joue effectivement un rôle actif dans la fission membranaire.**

Dans un précédent papier, Morita (Morita et al., 2010) note également des perturbations dans la ségrégation des chromosomes après mutation de VPS4 ou déplétion par siRNA de composants d'ESCRT. Les auteurs mettent ici en évidence plusieurs types de perturbation du faisceau mitotique, et plus généralement un défaut important dans la ségrégation des chromosomes au cours de

l'anaphase. Le lien entre ces observations et le rôle d'ESCRT durant l'abscission mérite cependant des études plus approfondies. Toutefois les auteurs notent des différences notables dans les phénotypes observés selon les protéines mutées, y compris entre isoformes : de fait, cette observation renforce l'idée que, au moins chez les eucaryotes, la présence de plusieurs isoformes résulte **d'une spécialisation de certaines protéines CHMP en fonction du processus cellulaire engagé.**

Enfin, un lien entre abscission médiée par ESCRT et composition lipidique de la membrane plasmique a été rapporté par Sagona (Sagona et al., 2010). Ici, les auteurs montrent d'une part que le PI3P joue un rôle dans la mise en place de la cytokinèse ; d'autre part, ils mettent en évidence une interaction entre CHMP4B et un nouveau régulateur : **TTC19**. Enfin, ils montrent que FYVE-CENT est capable d'interagir spécifiquement avec le PI3P et peut recruter TTC19 ; FYVE-CENT étant retrouvé à la fois au niveau du centrosome et du corps intermédiaire, ce papier suggère donc un lien entre les défauts observés au niveau des centrosomes et de l'abscission, d'une part, et l'impact du PI3P d'autre part. (voir **figure 26**)

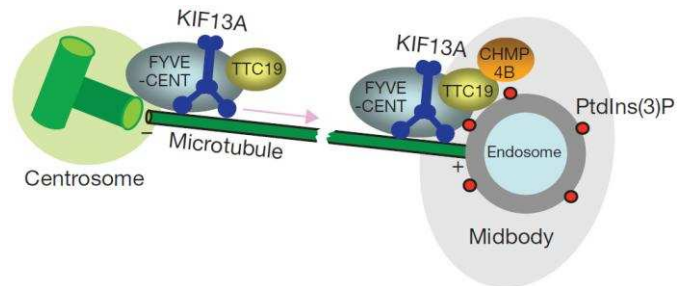


Figure 26: Action d'un nouveau régulateur d'ESCRT-III, TTC19, dans le cadre de la cytokinèse. D'après Sagona et al., 2010.

Les auteurs rapportent une nouvelle interaction entre TTC19 et CHMP4B. TTC19 servirait ici de protéine adaptatrice entre CHMP4B et FYVE-CENT. Cette dernière participerait à la colocalisation du complexe au niveau du corps intermédiaire en interagissant avec le PI3P.

L'interaction de TTC19 avec CHMP4B mérite cependant une étude plus approfondie pour comprendre son mécanisme.

III - CC2D1, un nouveau partenaire de CHMP4B

9. Caractérisation d'un nouveau mutant chez *Drosophila Melanogaster*

Le gène *Igd*, ou *lethal (2) giant discs*, est un gène suppresseur de tumeurs qui a été découvert **chez *Drosophila Melanogaster*** en 1971 (Bryant PJ, Schubiger G, 1971), sur une population de larves de mouches présentant une hyperplasie des disques imaginaux. **Les disques imaginaux** sont des sacs de tissu épithélial, issus de la segmentation de la larve, qui vont ultérieurement produire les ailes, les pattes et les antennes de l'insecte. Contrairement à d'autres gènes suppresseurs de tumeurs chez la *Drosophile* (Buratovich MA, Bryant PJ., 1997 ; Bryant et al., 1993 ; Watson et al., 1994 ; Hariharan IK, Bilder D, 2006) , l'hyperplasie observée chez les mutants *Igd*, ne s'accompagne pas d'une perturbation de l'organisation des disques : le gène *Igd* a donc été classifié dans le groupe des **gènes hyperplastiques** suppresseurs de tumeurs.

10. Rôle de la voie endosomale dans la signalisation du récepteur Notch

Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer l'hyperplasie induite chez les mutants *Igd*. Buratovich et Bryant (Buratovich MA, Bryant PJ., 1995) proposent que la mutation *Igd* perturbe la diffusion des gènes *wingless (wg)* et *decapentaplegic (dpp)*. *wg* est un membre de la famille des gènes *Wnt* qui code pour des protéines impliquées dans la signalisation, tandis que *dpp* appartient à la famille du *TGFβ* qui code pour des facteurs de croissance. Plus récemment, Klein (Thomas Klein, 2003) fait un parallèle entre l'expression ectopique du gène *wg* chez les mutants *Igd* et celle observée chez des mutants présentant une activation ectopique de la voie de signalisation de Notch. L'auteur montre, d'une part, que la voie de signalisation de Notch est également perturbée chez les mutants *Igd*, et d'autre part que **c'est l'activation aberrante du récepteur Notch qui est responsable du phénotype *Igd***.

La voie de signalisation de Notch est fortement conservée et a été impliquée dans de nombreux types de cancers (Miele et al., 2006). Notch constitue une famille de récepteurs transmembranaires (Tien AC, Rajan A, Bellen HJ, 2009), dont le rôle est de médier la communication de cellule à cellule, et qui va reconnaître dans sa partie extracellulaire les ligands *DSL (Delta, Serrate, Lag2)*. Contrairement à d'autres voies de signalisation, elle ne fait pas intervenir de messagers secondaires après activation par ces ligands. Le récepteur Notch activé est plutôt clivé par une série de protéases, dont la γ -sécrétase, qui génère un fragment de Notch (*NICD*) susceptible de transloquer vers le noyau pour activer une série de promoteurs : ce mode d'activation est donc appelé **activation ligand-dépendante** (Schweisguth F., 2004). Inversement, une activation **ligand-indépendante** a été rapportée *in vivo* (Sakata et al., 2004 ; Wilkin et al., 2004) : les auteurs ont ainsi montré que cette activation ligand-indépendante était liée à l'internalisation du récepteur par la voie endosomale, et sous la dépendance de l'Ubiquitine ligase *NEDD4*. Le caractère physiologique de ce second type d'activation est en revanche discuté, car il pourrait s'agir d'un mécanisme aberrant. En effet, la persistance du récepteur à la surface des endosomes semble induire un clivage ainsi qu'une production de *NICD* indépendamment de toute signalisation : dans certains cas **la voie endosomale préviendrait donc physiologiquement ce clivage**, en ciblant par monoubiquitination les récepteurs inactifs vers la voie de dégradation. (voir figure 27)

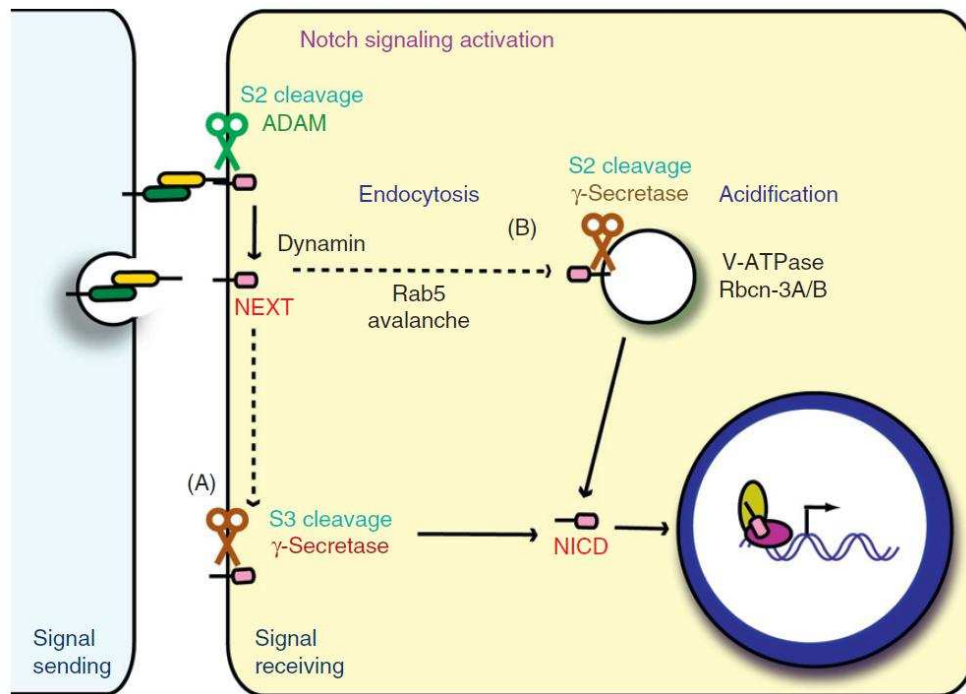


Figure 27: la fixation du ligand à Notch induit le clivage de ce dernier, et la formation du peptide NICD selon deux modalités. Ce clivage peut être médié par plusieurs protéases, selon la localisation du récepteur. Ici, l'endocytose du récepteur Notch favoriserait son clivage en position S2 par la γ -sécrétase. (Yamamoto et al., 2010)

En inactivant certains régulateurs de cette voie endosomale, il est donc possible d'induire une signalisation aberrante voire ectopique liée à Notch.

10.1 Implication de Lethal Giant Discs dans la régulation de Notch

Afin de préciser les modalités de cette hyperactivation ligand-indépendante de Notch, trois auteurs ont ainsi étudié, *in vivo*, le rôle de la protéine LgD (Gallagher CM, Knoblich JA, 2006 ; Childress et al., 2006 ; Jaekel R, Klein T, 2006) dans cette voie de signalisation. Ils montrent que LgD est présente dans le cytoplasme, et qu'elle est impliquée dans la régulation de Notch. **En l'absence de LgD**, Notch est activée dans les disques imaginaux indépendamment du ligand. La surexpression de LgD induit globalement **l'accumulation de Notch sur des structures endosomales élargies** (Jaekel R, Klein T, 2006), positives pour Rab7, et dans certains cas pour Rab5 et l'Ubiquitine. **Cette donnée suggère donc fortement que LgD est impliquée dans la voie endosomale à un stade tardif, et qu'elle induit l'accumulation de protéines ubiquitinylées en route vers le lysosome.** De plus LgD présente un domaine C2 en c-terminal, fortement conservé, et capable d'interagir spécifiquement avec des monophosphoinositides (PI3P, PI4P, PI5P) (Gallagher CM, Knoblich JA, 2006). Les domaines C2 sont généralement impliqués dans des interactions protéine/protéine, ou des interactions lipide/protéine (Hurley et Misra, 2000). Dans ce cas, des larves exprimant une version tronquée de LgD ne possédant pas ce domaine C2 présentent une

suractivation de Notch, ce qui suggère donc que la capacité du domaine C2 à fixer des monophosphoinositides est importante pour la fonction de la protéine.

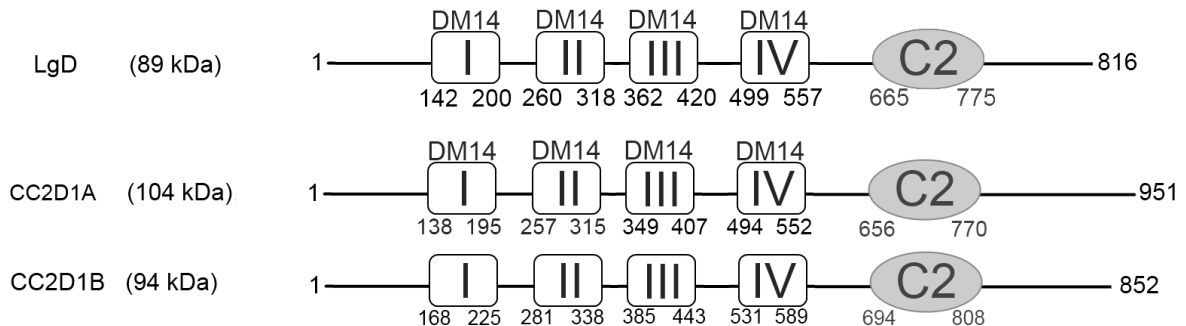


Figure 28: Lethal Giant Discs possède deux orthologues chez les mammifères, notamment Homo Sapiens, appelés CC2D1A et CC2D1B.

Les domaines reconnus par le logiciel en ligne SMART comprennent quatre répétitions DM14 en n-terminal, ainsi qu'un domaine C2 en c-terminal. L'organisation générale de ces protéines est très proche, avec cependant la présence d'une région c-terminale plus importante chez CC2D1A, par rapport à LgD et CC2D1B.

En outre, Gallagher et Knoblich montrent que le défaut induit par lgd peut être reconstitué en surexprimant lgd dans sa version native, ou une construction ne possédant pas le domaine C2; inversement la surexpression d'une construction ne possédant que le domaine C2 n'induit aucune modification. La même équipe met également en évidence un mutant lgd de phénotype similaire présentant la mutation simple P557S, soit au niveau de la quatrième répétition DM14, donc en amont du domaine C2.

Les auteurs en concluent donc que, d'une part, la protéine LgD doit être présente en quantités normales pour accomplir sa fonction, et que **sa surexpression doit également induire la déplétion d'un partenaire important susceptible d'interagir en n-terminal de la protéine.**

10.2 Des arguments en faveur d'un lien direct entre LgD et ESCRT

La présence de compartiments endosomaux élargis chez les mutants lgd a été rapportée chez la drosophile pour des mutants hrs et erupted, l'équivalent de tsg101 chez la mouche, (Vaccari T, Bilder D., 2005 ; Jekely et al., 2003 ; Moberg et al., 2005), également dans le cadre de travaux sur Notch. Il existe par ailleurs un lien établi entre l'activation ligand-indépendante de Notch et un défaut dans la machinerie ESCRT (Thompson et al., 2005) : l'équipe de Vaccari (Vaccari et al., 2009) a précisé ce lien en montrant que Notch pouvait s'accumuler à plusieurs stades de la voie endosomale, et que son activation était probablement une conséquence de son transport vers l'endosome.

La voie du récepteur Notch est un cas particulier de signalisation où l'internalisation du récepteur vers l'endosome, notamment par le biais d'ESCRT, peut sous certaines conditions entraîner une stimulation de la signalisation. La proximité des phénotypes observés entre les mutants ESCRTI/II et les

mutants Lgd suggère donc fortement une implication de LgD dans la machinerie ESCRT. Comme le notent Gallagher et Knoblich, ce lien semble en revanche complexe ; en effet la perte d'ESCRT-I/II ou de Lgd induit une suractivation de Notch, alors qu'elle n'est observée ni chez les mutants hrs, ni les double mutants hrs, lgd. (Gallagher CM, Knoblich JA, 2006 ; Childress et al., 2006). Il semble donc **que LgD agisse en aval de Hrs**, au niveau des endosomes ; en revanche, Notch semble également s'accumuler dans deux population distinctes d'endosome précoce, ce qui expliquerait les disparités observées entre les mutants hrs et les mutants ESCRT ou lgd.

11. LgD appartient à une nouvelle famille de protéines non caractérisée

11.1 Une famille conservée chez les eucaryotes

Il a été montré (Jaekel R, Klein T, 2006) que les deux orthologues murins de Lgd, mCC2D1A et mCC2D1B, pouvaient compléter Lgd au cours du développement des ailes de la drosophile. Cette donnée suggère fortement que la fonction de LgD est conservée chez les mammifères et que cette famille de protéines présente des propriétés similaires entre espèces. Bien qu'on retrouve deux orthologues chez les mammifères, la mouche Drosophile ne présente elle qu'une seule forme connue de LgD. CC2D1B présente le plus d'homologies avec LgD, tandis que CC2D1A diffère avec une séquence c-terminale plus longue. Chez l'homme, CC2D1A est également appelée Freud-1 (Ou et al., 2003), MRT3 et Aki1 (Nakamura et al., 2008). (**voir figure 28**)

LgD appartient à une nouvelle famille de protéines, la famille CC2D1 (Coiled-Coil **C2 Domain containing 1**). Les protéines composant cette famille partagent une organisation similaire, avec quatre répétitions DM14 en n-terminal et un domaine C2 en c-terminal. Les répétitions DM14 ont été identifiées sur la base d'études bioinformatiques (Ponting et al., 2001) : en l'état, rien ne permet de considérer ces répétitions comme des domaines à part entière, c'est-à-dire comme des séquences linéaires capables de se structurer de façon **indépendante**. Les répétitions DM14 sont souvent présentes en tandem, et longues d'environ 70 acides aminés. Elles sont prédites comme majoritairement hélicales, mais aucune donnée expérimentale ne permet de l'affirmer précisément. Elles ont en revanche été impliquées dans plusieurs interactions protéines, ainsi que dans de multiples voies de signalisation.

11.2 Les autres rôles de la famille CC2D

11.2.1 Freud-1/CC2D1A dans le retard mental non syndromique

Freud-1 a été impliqué dans des cas de retard mental non syndromique (NSMR) (Basel-Vanagaite et al., 2006). En effet, une mutation chez certains patients induit la production d'une protéine Freud-1 aberrante, tronquée après la troisième répétition DM14, et ne possédant donc pas la dernière répétition, ainsi que le domaine C2. En outre, Freud-1/CC2D1A et Freud-2/CC2D1B ont été impliqués dans la régulation du gène codant pour le récepteur de la sérotonine (5-HT1A) en se fixant directement sur son promoteur en deux sites distincts (Ou et al., 2003 ; Hadjighassem et al., 2010). Ou observe par ailleurs une perte d'interaction in vitro avec l'ADN en délétant une séquence de 8 acides aminés au début du domaine C2, ce qui suggère un rôle de ce dernier dans la régulation transcriptionnelle. Bien que le lien entre retard mental non syndromique et dérégulation du gène du récepteur de la sérotonine ait été proposé (Rogaeva et al., 2007), les bases moléculaires de cette maladie génétique restent encore méconnues.

Le gène Freud-1 code chez les hommes et les souris pour au moins deux isoformes (Rogaeva & Albert, 2007), exprimés de façon ubiquitaire dans tous les organes, mais avec cependant quelques

disparités. L'isoforme court ne possède que les deux dernières répétitions DM14 ainsi que le domaine C2. Il semble que l'isoforme long soit, chez l'homme, le principal régulateur transcriptionnel. **Un rôle potentiel de l'isoforme court dans d'autres voies de signalisation reste cependant à élucider.**

Un autre lien entre CC2D1A et le retard mental non syndromique a également été associé à son rôle dans la maturation des synapses du système nerveux central (Zhao et al., 2011). Les auteurs remarquent ici que des souris KO pour CC2D1A meurent à la naissance, probablement en raison d'une incapacité à respirer. En revanche, ils ne notent aucune perturbation anatomique évidente en analysant leurs organes internes (coeur, poumon, cerveau). Ils observent que CC2D1A est particulièrement exprimé dans le cerveau, notamment le cortex, et postulent une perturbation de la fonction synaptique centrale, **en particulier de la transmission synaptique.** Bien que CC2D1A soit enrichi dans les synaptosomes, il n'est en revanche pas établi de lien direct entre la protéine et la libération de neurotransmetteurs.

11.2.2 CC2D1A dans la régulation de l'immunité innée

L'immunité innée fait intervenir une catégorie de récepteurs transmembranaires, les PRRs (ou **Pattern-Recognition Receptors**), parmi lesquels figure la sous-catégorie des récepteurs Toll. Après reconnaissance de certains épitopes à la surface des pathogènes, réunis sous l'acronyme PAMP (ou **Pathogen-Associated Molecular Patterns**), ils vont activer les voies de signalisation NF- κ B, MAPK et IRF3/7. TBK1 (**TANK-Binding Kinase 1**) a été identifié comme un inhibiteur de la κ B kinase ϵ et participe à la transduction du signal vers la production d'IFN- β . CC2D1A avait lui-même été impliqué dans une première étude (Zhao et al., 2010) comme activateur de la voie NF- κ B. Récemment une interaction potentielle entre TBK1 et CC2D1A a été rapportée (Chang et al., 2011) par immunoprécipitation. Les auteurs montrent que cette interaction est dépendante de la partie n-terminale de la protéine, comprenant les quatre répétitions DM14 et que les deux protéines colocalisent *in vivo*. En outre ils montrent que CC2D1A se distribue à la fois dans le cytosol et au niveau de compartiments de la voie endolysosomale positifs pour les marqueurs Rab5 (endosome précoce) et Lamp1 (lysosome). Enfin, ils montrent que CC2D1A est impliquée dans l'activation de NF- κ B en aval de TBK1.

Bien que ces travaux ne permettent pas de conclure à une interaction **directe** de CC2D1A avec TBK1, en particulier au niveau des endosomes précoces, ils sont en revanche très pertinents au regard de la littérature récente. En effet, TBK1 a également été impliqué dans l'atténuation du bourgeonnement du HIV par le biais d'ESCRT-I (Da & Yang et al., 2011), et d'une façon dépendante de son domaine tardif **PTAP**. Cette équipe montre en outre une interaction directe **entre la partie c-terminale de TBK1 et VPS37C**, ainsi qu'une possible phosphorylation de VPS37C TBK1-dépendante. CC2D1A ayant déjà été impliquée dans des processus ESCRT-dépendant chez la drosophile, un nouveau lien par le biais de TBK1 chez l'homme mériterait d'être étudié plus en détail.

TBK1 pourrait également interagir avec Akt dans le cadre de processus d'autophagie (Weidberg H, Elazar Z, 2011 ; Xie et al., 2011 ; Ou et al., 2011). Or, un troisième papier rapporte une interaction entre CC2D1A et la protéine kinase PDK1 (Nakamura et al., 2008) par le biais de la quatrième répétition DM14, et dans le cadre de la régulation du récepteur à l'EGF. Cette donnée complexifie donc un peu plus les rapports entre les voies de signalisation dépendantes d'Akt et de TBK1 puisque PDK1 régule directement la fonction d'Akt au niveau de la membrane plasmique.

11.2.3 Aki1/CC2D1A dans la cohésion du centrosome

CC2D1A a enfin été directement impliquée dans le maintien de la cohésion du centrosome au cours de la division cellulaire (Nakamura et al., 2009 ; 2010). Avant la mitose, le centrosome va se dupliquer et migrer aux deux pôles de la cellule pour organiser le fuseau mitotique et participer à la bonne ségrégation des chromosomes. En revanche, des défauts dans le maintien de la structure du centrosome pendant cette étape peuvent conduire à la formation de fuseaux multipolaires (**multipolar spindle**) aberrants. Ici, les auteurs montrent que CC2D1A, outre son implication dans la voie de l'EGF (Nakamura et al., 2008), colocalise également avec les centrosomes pendant la mitose où il prévient leur séparation prématurée. Ce travail montre également que CC2D1A interagit avec le complexe Cohesine, et que cette interaction est dépendante d'une région n-terminale comprenant les trois premières répétitions DM14.

Ensemble, ces fonctions suggèrent donc fortement que LgD/Aki1/CC2D1A est une protéine échaffaudage (ou « **scaffold** ») impliquée dans de multiples fonctions, et qu'elle interagit potentiellement avec plusieurs partenaires différents selon sa localisation. Une de ces fonctions touche la voie endolysosomale, probablement en relation avec la machinerie ESCRT : on retrouve d'ailleurs un rôle dans le cycle cellulaire, avec l'apparition de phénotypes aberrants déjà observés au cours de la déplétion de certains membres d'ESCRT (Carlton et al., 2008).

IV – Objectifs du travail de thèse

Mon projet de thèse portait sur **l'étude structurale et fonctionnelle des protéines CHMP et de leurs ligands, notamment dans le cadre du bourgeonnement du HIV.**

La première partie de ce travail a consisté en la caractérisation de la protéine LgD, ainsi que de ses homologues. Avant mon arrivée, Bettina Hartlieb, postdoctante au laboratoire, avait confirmé une interaction in vitro de CC2D1A avec CHMP4B. Elle a également pu mettre en évidence que la troisième répétition DM14 était suffisante pour lier l'extrémité N-terminale de CHMP4B et a complété cette étude par une mesure de son affinité (MALLS et ITC). Au cours de mon Master 2, en parallèle de ces travaux, j'ai également ébauché une étude d'un fragment c-terminal de LgD comprenant le domaine C2. J'ai poursuivi sur cette thématique en thèse, avec comme objectif de parvenir **à résoudre la structure de cette protéine et de déterminer les bases de son interaction avec CHMP4B.**

Au cours de mon doctorat j'ai également été amené à collaborer avec l'équipe du Pr. Rémy Sadoul **sur la fonction de la protéine CHMP2B.** Ce projet consistait initialement en la reproduction de tubes CHMP3-CHMP2B similaires à ceux déjà obtenus au laboratoire avec CHMP2A (Lata et al., 2008). L'hypothèse de départ était que CHMP2B puisse être incorporé dans des polymères ESCRT-III de la même façon que son homologue : cette thématique était en revanche distincte des études sur le bourgeonnement du VIH, et touchait plus au rôle des polymères ESCRT-III dans certaines pathologies neurodégénératives.

CHAPITRE II - Matériel & Méthodes

I - Biologie Moléculaire

1.1 Clonage – Tableau des constructions réalisées et/ou testées pour cette étude.

Nom	Vecteur	Enzymes de Restriction	Souche	Remarques générales
LgD 550 – 816	pProex htB	NarI / BamHI	BL21	Cloné par B. Hartlieb.
LgD 568 – 809	pProex htB	NarI / BamHI	-	Non testé.
LgD 575 - 816	pProex htB	NarI / BamHI	BL21	Clone personnel
LgD 491 – 816	pProex htB	NarI / BamHI	BL21	Clone personnel
LgD 358 – 816	pProex htB	NarI / BamHI	BL21	Clone personnel
LgD 142 – 816	pProex htB	NarI / BamHI	BL21/Rosetta	Clone personnel
LgD 1 - 816	pProex htB	NarI / BamHI	BL21/Rosetta	Clone personnel
LgD 1 – 562	pProex htB	NC	BL21/Rosetta	Cloné par B. Hartlieb.
CC2D1B 1 - 852	pProexhtB	NarI/BamHI	BL21	Clone personnel
CC2D1B 1 – 600	pET28	NC	BL21	Cloné par B. Hartlieb.
CC2D1A 346 – 455	pET28	NC	BL21	Cloné par B. Hartlieb.
CC2D1A 346 – 455 K374A, R376A, R380A, K383A, D387A, R390A, K393A	pETM41	NcoI / PstI	BL21	Clone personnel
6xHis-Shrub	pProexHtB	NcoI/BamHI	BL21	Clone personnel
Shrub – 6xHis	pETM13	NcoI / XhoI	BL21	Clone personnel
MBP Shrub 19 – 93	pETM41	NcoI / KpnI	BL21	Clone personnel
MBP Shrub 9 – 102	pETM41	NcoI / KpnI	BL21	Clone personnel
MBP CHMP4B _{ΔC-Alix}	pBADM41	NC	BL21	Pires et al., 2009
MBP CHMP4B 7 – 105	pBADM41	NC	BL21	Cloné par B. Hartlieb

MBP CHMP4B 7 – 105 R28A, R30A, D31R, E33R	pETM41	NcoI / KpnI	BL21	Clone personnel
MBP CHMP4B 7 – 105 E90R, E94R, E97R	pETM41	NcoI /KpnI	BL21	Clone personnel
MBP CHMP4B 7 – 105 R28A, R30A, D31R, E33R E90R, E94R, E97R	pETM41	NcoI / KpnI	BL21	Clone personnel
CHMP4B – 6xHis	pETM13	NcoI /XhoI	BL21	Cloné par P. Macheboeuf.
CHMP4B – 6xHis Cys	pETM13	NcoI /XhoI	BL21	Cloné par P. Macheboeuf.
CHMP4B 1-154-Flag	pBJ5	XhoI / NotI	293T	Clone personnel
CHMP4B 1-154-Flag R28A, R30A, D31R, E33R	pBJ5	XhoI / NotI	293T	Clone personnel
CHMP4B 1-154-Flag E90R, E94R, E97R	pBJ5	XhoI / NotI	293T	Clone personnel
MBP –CHMP2B	pMAL-C2x	NC	BL21	Coll. R.Sadoul
CHMP2B – 6xHis	pETM13	NcoI /XhoI	BL21/ Rosetta	Clone personnel
CHMP2B – 6xHis R26A, R30A	pETM13	NcoI /XhoI	BL21	Coll. R. Sadoul
CHMP2B – 6xHis A57D, V60D	pETM13	NcoI /XhoI	BL21	Coll. R.Sadoul
CHMP2B – 6xHis L4D, F5D	pETM13	NcoI /XhoI	BL21	Coll. R. Sadoul
MBP - CHMP2B 43 – 213	pBADM41	NcoI / XhoI	BL21/ Rosetta	Clone personnel
CHMP2B 9 – 213 6xHis	pETM13	NcoI / XhoI		Non testé.
CHMP2BAC 1 – 154 – 6xHis	pETM13	NcoI / XhoI	BL21	Clone personnel
CHMP2BAC 1 – 154 – 6xHis Cys	pETM13	NcoI / XhoI	BL21	Clone personnel
CHMP2BAC 1 – 181	pETM13	NcoI / XhoI	BL21	Clone personnel
MBP- CHMP3 67 – 222	pBADM41	NcoI / XhoI	BL21	Clone personnel
6xHis – CHMP3AC	pProex htB	NC	BL21	Muziol et al., 2006

Les clones ont été obtenus par les méthodes conventionnelles. Brièvement, deux sites de restriction sont insérés aux extrémités de la séquence à cloner par technique PCR. La séquence amplifiée est purifiée par extraction sur gel (protocole Sigma), puis digérée séquentiellement avec les enzymes de restriction indiqués dans le tableau . Le plasmide est linéarisé par digestion avec les mêmes enzymes et purifié par extraction sur gel selon le même protocole. Plasmide et insert sont ligués par la T4 DNA ligase sans étape préalable de déphosphorylation. La construction est transformée dans une souche DH5 α et les colonies positives toutes testées par séquençage (MWG Operon), après digestion-contrôle préalable pour vérification de la présence de l'insert.

1.2 Clonage – les vecteurs d’expression

Nom	Résistance	Induction
pETM13	Kanamycine	IPTG
pETM41	Kanamycine	IPTG
pProex-htB	Ampiciline	IPTG
pBJ5	Ampiciline	-
pMal-C2x	Ampiciline	IPTG
pBADM41	Ampiciline	Arabinose

II Interactions CC2D1A – CHMP4B

2.1 Purification du fragment CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅.

Le fragment est produit dans une souche BL21 codon plus (Invitrogen) chez E.Coli. Après induction pendant 3h avec 1mM IPTG, le culot est resuspendu et soniqué dans un tampon de lyse (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 1 mM PMSF). Le lysat est centrifugé, puis filtré à 0.2 µM et chargé sur une résine Ni-NTA superflow (Qiagen) ou Ni-NTA (Sigma). La résine est lavée par un tampon riche en sel (50 mM Tris pH 7.4, 1M NaCl) puis par un second lavage avec un tampon d’élution (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) complétement de 50 mM Imidazole. La protéine est éluée à 250 mM Imidazole. L’étiquette histidine en n-terminal est clivée en incubant l’échantillon avec la protéase TEV sur la nuit selon les protocoles standards, à un ratio de 2 µg pour 1 mg de protéine à 4°C. L’échantillon est dialysé dans un tampon 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole, puis chargé sur résine Ni-NTA. La fraction non liée à la résine est ensuite concentrée puis charge sur colonne S75.

2.2 Formation du complexe CC2D1A / CHMP4B par pulldown.

La construction MBP-CHMP4B₇₋₁₀₅ est clonée dans le vecteur pBADM41 et exprimée sur 1h en souche BL21 codon plus, après induction avec 0.2% Arabinose. Les mutants sont clonés dans le vecteur pETM41 et induits pendant 2h avec 1 mM IPTG. 1L de culture est produit pour chaque purification. Les bactéries sont ensuite lysées par sonication, resuspendues dans un tampon 20 mM Tris pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol. La solution est filtrée à 0.2 µM, puis chargée sur une résine amylose (Amersham). La résine est lavée avec un tampon supplémenté de 1M NaCl, puis rééquilibrée dans 100 mM NaCl. Le fragment CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ est exprimé séparément et purifié sur colonne Ni-NTA 3 mg de protéine sont incubés avec une résine amylose comprenant les constructions MBPCHMP4B₇₋₁₀₅ sauvages ou mutantes, pendant 30 minutes. La résine est ensuite lavée avec cinq volumes de colonne de tampon de lyse, puis éluée avec un tampon d’élution supplémenté de 20 mM Maltose. Chaque échantillon est élué avec le même volume, puis chargé sur gel SDS-PAGE pour contrôler l’efficacité du pulldown.

2.3 Formation du complexe CC2D1A / CHMP4B par méthode batch.

Les fragment CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ sauvage et mutant sont clivés et purifiés selon le protocole décrit précédemment. La construction MBP-CHMP4B₇₋₁₀₅ est purifiée sur colonne S200 et élue en un pic unique

et symétrique. 30 μ L de résine d'amylose (Amersham) sont saturées avec un excès de MBP-CHMP4B₇₋₁₀₅. La fraction non liée à la résine est lavée trois fois dans un tampon 25 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl. Les fragments CC2D1A sauvage et mutant sont incubés pendant 1h à température ambiante en excès (5fois), puis la fraction non liée est lavée cinq fois. Les résines sont ensuite chargées sur gel SDS-PAGE pour révéler la présence ou non du fragment.

2.4 Expériences de co-sédimentation CC2D1A / CHMP4B.

La construction CHMP4B _{Δ C-Alix} est purifiée à partir du clone utilisé dans une précédente étude (Pires et al., 2009), et selon le protocole décrit dans la section III du présent chapitre. Les fragments CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ sauvage et mutant sont produits jusqu'à homogénéité selon le protocole décrit page précédente. La protéine monomérique CHMP4B _{Δ C-Alix} (1.5 μ M) est concentrée en présence de CC2D1A en excès (5 fois) dans un concentrateur Vivaspin 15 (Invitrogen) jusqu'à 15 μ M. La MBP est clivée en présence de protéase TEV selon un ratio de 1 :10 (w/w) à 4°C sur la nuit afin de promouvoir la polymérisation de la construction. Un gradient de sucrose est réalisé à partir de tampon HBS (10 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl) en superposant une solution de 60% sucrose (65 μ L), de 40%, 30%, 20% puis 5% (85 μ L). Le gradient est ultracentrifugé pendant 6h à 40000 rpm dans un rotor Beckman SW55. Les fractions correspondantes sont ensuite chargées sur gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie.

2.5 Mesures d'interactions par SPR (CC2D1A).

Les mesures SPR ont été réalisées sur un instrument Biacore X (Biacore Inc.), à 25°C dans un tampon SPR (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% P20). Les puces CM5 sont couplées avec la construction CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ (100 RU). Les analytes (MBP CHMP4B₇₋₁₀₅ et mutants) sont injectés sur la puce CM5 à un débit de 10 μ L/min, et la dissociation mesurée pendant 10 minutes. La construction sauvage est testée sur un ensemble de concentrations de 0.062 μ M à 0.47 μ M, et les mutants de 0.525 μ M à 1.4 μ M. La puce est régénérée avec 50 μ L à 2M NaCl à 50 μ L/min. Les cinétiques d'interaction sont évaluées avec la suite logicielle BiaEvaluation (version 4.1, Biacore, Inc.) en utilisant le modèle Langmuir 1 :1 sans transfert de masse, mais corrigées pour une ligne de base fluctuante (« ou drifting baseline ») si nécessaire.

III Purification et Caractérisation de LgD

3.1 Purification de Lethal Giant Discs chez E.Coli.

La protéine LgD₅₅₀₋₈₁₆ est produite dans une souche BL21 codon plus (Invitrogen) chez E.Coli. Après induction pendant 3h avec 1mM IPTG, le culot est resuspendu et soniqué dans un tampon de lyse (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, 20 mM Imidazole, inhibiteurs de protéase), supplémenté d'une tablette d'inhibiteurs de protéase complète sans EDTA (Roche). Le lysat est centrifugé, puis filtré à 0.2 μ M et chargé sur une résine Ni-NTA superflow (Qiagen) ou Ni-NTA (Sigma). La résine est lavée par un tampon riche en sel (50 mM Tris pH 7.5, 1M NaCl, 5 mM, β -mercaptoéthanol) puis par un second lavage avec un tampon d'élution (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol) complémenté de 50 mM Imidazole. La protéine est éluée à 250 mM Imidazole. L'étiquette histidine en N-terminal est clivée en incubant l'échantillon avec la protéase TEV sur la nuit selon les protocoles standards, à 4°C. L'échantillon est dialysé dans un tampon d'élution à 20 mM

Imidazole, sous agitation modeste afin d'éviter toute aggrégation, puis élué sur une seconde résine Ni-NTA prééquilibrée dans le tampon de dialyse. La fraction non liée à la résine constitue l'échantillon LgD clivé : la protéine est enfin concentrée puis chargée sur Superdex 75 (GE Healthcare), où elle élué en un pic unique correspondant au monomère. Ce protocole est identique pour la construction LgD₄₉₁₋₈₁₆.

LgD₃₅₈₋₈₁₆ est induite selon le même protocole sur 3H à 37° ou sur la nuit à 18°, puis resuspendu dans un volume de 100 mL de tampon de lyse pour 3 litres de culture. Après sonication, le lysat centrifugé puis filtré, et chargé sur colonne Ni-NTA de façon similaire aux précédentes constructions. Après clivage TEV puis une seconde purification, la protéine est dialysée dans un tampon MonoS (25 mM Sodium Citrate pH 6, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol. Une chromatographie échangeuse d'anions est réalisée en chargeant l'échantillon sur une colonne MonoS (Amersham) équilibrée dans le même tampon. Un gradient est réalisé sur 120 volumes de colonne contre un buffer B (25 mM Sodium Citrate pH 6, 1M NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol), et la protéine élué en un seul pic, à une concentration saline approximative de 400 mM NaCl, pour ce pH. Les fractions sont concentrées et immédiatement chargées sur une colonne Superdex 200 (GE Healthcare), préalablement équilibrée dans le tampon MonoS. Afin d'éviter tout phénomène d'aggrégation, l'échantillon est concentré seulement jusqu'à 3 mg/ml. LgD₃₅₈₋₈₁₆ élué sur S200 comme une protéine monomérique et soluble de 51 kDa.

3.2 Préparation des liposomes (LgD).

Les lipides Synthetic 1-Stearoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (SOPC) et 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoserine (DOPS) et phosphatidylinositol 4-phosphate de Avanti Polar Lipids sont mélangés de façon homogène dans du chloroforme. La solution est évaporée et le film lipidique est resuspendu dans un tampon (20mM Tris pH7, 150 mM NaCl) à une concentration finale de 2.5 mg/ml. La solution est extraite 15 fois à travers une membrane de polycarbonates de 200 nm (Avanti Polar Lipids) afin de produire les larges vésicules unilamellaires (LUVs).. Le diamètre moyen des liposomes est estimé entre 200 et 400 nm, sur la base des mesures de DLS (Dynamic Light Scattering) et des observations en microscopie électronique.

3.3 Tests de flottation (LgD).

Le fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ est incubée sur la nuit en présence des LUVs. La solution est mélangée avec un volume équivalent d'une solution de sucrose à 80% (w/v) en présence 50 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol, ce qui conduit à une concentration finale de sucrose de 40% ainsi qu'une concentration finale de LUVs de 0.625 mg/ml. 300 µL de cette solution forment la couche basse du gradient. 100 µL d'une solution à 30%, 20% puis 10%, dans le même tampon, constituent les couches intermédiaires et hautes du gradient. Ce gradient est ultracentrifugé à 190000g pendant 6h à 4°C. Après ultracentrifugation, les gradients sont séparés en sept fractions; un tiers de chaque fraction est ensuite analysé par SDS-PAGE.

3.4 Cristallogénèse – cas des cristaux obtenus à partir du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆.

Après filtration sur gel, les fractions contenant la protéine LgD₅₅₀₋₈₁₆ sont concentrées jusqu'à 5 mg/mL sur un concentrateur Vivaspin 15. L'échantillon concentré est préalablement ultracentrifugé dans un dispositif Airfuge (Beckmann) à 40000 rpm puis le surnageant prélevé afin d'éliminer tout agrégat : la monodispersité de l'échantillon est vérifiée par mesure de la diffusion dynamique de lumière (DLS) Les cristaux de LgD₅₅₀₋₈₁₆ sont produits en goutte suspendue à 16°C, à partir de la solution concentrée de

LgD₅₅₀₋₈₁₆ et de la solution de cristallisation, selon un ratio (w/w) de 1/1, pour un volume total dans la goutte de 2µL. Le réservoir contient une solution à 100 mM Bis-Tris pH 6.5, 15-25% PEG 3500 Mme, 200 mM Ammonium Sulfate. Les cristaux poussent en moyenne après 3 semaines ou 1 mois. Pour la collection des données, les cristaux sont transférés dans une solution cryo correspondant à la solution de cristallisation complétée de 25 % glycérol, puis plongés dans l'azote liquide. Les cristaux sélénométhionylés produits à partir de LgD₅₅₀₋₈₁₆ sont reproduits dans des conditions semblables. Deux jeux de donnée (natifs et SAD) sont collectés sur ID14-4 (ESRF).

3.5 Résolution de la structure du fragment LgD 550-816 et construction du modèle.

La structure du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ a été initialement déterminée par méthode SAD (single wavelength anomalous dispersion) à partir d'un échantillon sélénométhionylé. Un spectre d'absorption est réalisé sur le cristal pour vérifier la présence de Sélénium, puis un jeu de donnée complet est collecté sur 230° pour une oscillation de 1° par cliché, à une longueur d'onde de 0.9795Å sur la ligne ID14-4 de l'ESRF, correspondant au pic d'absorption du Sélénium. Des points de diffraction sont détectés jusqu'à une résolution maximale de 2.4Å. Le cristal SAD est indexé avec iMOSFLM (Battye et al., 2011) dans le groupe d'espace P21 (a=87.08 ; b=53.77 ; c = 97.26 ; $\alpha = 90$ $\beta = 99.48$ $\gamma = 90$) après vérification des absences systématiques sur l'axe k. Ce jeu de données présente un dommage radiatif important pour les derniers clichés de diffraction : après intégration par SCALA (Evans P., 2006), les statistiques mettent en évidence une valeur Rmerge élevée de l'ordre de 0.2 pour les 50 derniers degrés d'oscillation. Ce jeu de donnée est réintégré sur 190° en coupant la résolution à 2.9Å, pour un rapport signal/bruit global de 7. Le coefficient de Matthews, pour une protéine d'environ 32000 Daltons et deux molécules par unité asymétrique, a été estimé à 3.51 (environ 65% de solvant) et ne représente donc pas la solution la plus probable à cette résolution. En première intention un phasage avait été tenté manuellement en considérant 3 molécules par unité asymétrique (Coefficient de Matthews à 2.34), mais ces tentatives n'avaient pas permis la résolution de la structure.

On peut estimer à 7 le nombre d'atomes lourds détectables par monomère pour le phasage, avec deux molécules par unité asymétrique. Ce jeu de donnée est soumis au serveur en ligne AUTO-RICKSHAW (Panjikar et al., 2005 ; 2009) en utilisant le protocole SAD, et en imposant manuellement un total de 14 atomes lourds. Un premier ensemble potentiel de vingt atomes lourds est déterminé par SHELXD (Schneider & Sheldrick, 2002). Cette liste est affinée par le logiciel MLPHARE (Otwinowski, 1991) puis réduite à dix sites après sélection de la bonne main. Les phases sont améliorées dans un premier temps par le logiciel DM (Cowtan, 1994) avec **une FOM de 0.699** puis dans un second temps en utilisant les opérateurs non-cristallographiques de symétrie déterminés par ce dernier (NCS-

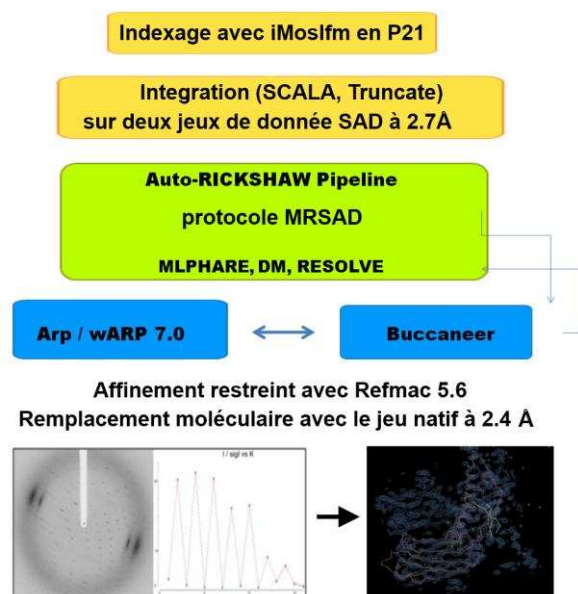


Figure 29 : les différentes étapes de résolution de la structure du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆

averaging). A partir de cette première carte de densité, les logiciels HELICAP (Morris et al., 2004) et BUCCANEER (Cowtan, 2006) tracent un modèle incomplet de l'unité asymétrique. Ce modèle partiel est ensuite utilisé pour l'affinement par REFMAC 5.6 (Murshudov et al., 2011) à une résolution de 2.9Å ($R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ à 0.29 / 0.34).

Ce modèle est utilisé comme référence pour le remplacement moléculaire avec PHASER 2.0 (McCoy et al., 2007), sur un jeu de données natif et isomorphe de 2.4Å. Les chaînes latérales sont placées manuellement avec le logiciel WINCOOT, et les phases améliorées successivement par le logiciel REFMAC 5.6. Enfin, les molécules d'eau sont ajoutées manuellement en fin de construction avant un ultime cycle de REFMAC ($R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ à 0.24 / 0.28). (voir figure 29)

3.6 Traitement des données SAXS des fragments LgD.

Les constructions LgD₅₇₅₋₈₁₆ et LgD₄₉₁₋₈₁₆ sont purifiées dans un tampon 25 mM Tris pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol. Le fragment LgD₃₅₈₋₈₁₆ est préparé dans un tampon citrate (25 mM Sodium Citrate pH 6.5, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol). Plusieurs mesures de 180 sec. à 25°C de la même solution ont été réalisées sur ID14-3 (ESRF) afin d'évaluer le dommage radiatif. La diffraction liée au tampon a été soustraite des données brutes, et les courbes obtenues à une longueur d'onde de 0.931Å mises à l'échelle en fonction de la concentration des échantillons. Les intensités sont normalisées à partir d'une solution de BSA de concentration connue. Le traitement des données a été réalisé avec la suite logicielle PRIMUS (Konarev et al., 2003). La diffraction $I(0)$ et le rayon de giration R_g sont évalués par une approximation de Guinier (Guinier, 1939), en assimilant l'intensité aux petits angles par $I(s) = I(0) \exp(-(sR_g)^2/3)$. Ces paramètres ont été traités par le logiciel GNOM (Svergun, 1992), qui fournit également la fonction de distribution des distances $p(r)$ de la particule ($p(r)=2\pi \int I(s)r \sin(sr)ds$).

3.7 Modélisation Ab Initio des fragments LgD.

Les modèles basse-résolution des fragments sont générés par le programme DAMMIN (Svergun, 1999) à partir d'un volume défini par une sphère de diamètre D_{max} . A partir d'un premier modèle aléatoire, DAMMIN utilise un algorithme de recuit simulé pour construire un modèle en accord avec la courbe de diffraction expérimentale $I_{\text{exp}}(s)$:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(s_j) - cI_{\text{calc}}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2$$

Où N est le nombre de points expérimentaux, c un facteur correctif, $I_{\text{calc}}(s_j)$ l'intensité calculée et $\sigma(s_j)$ l'erreur expérimentale au moment de transfert s_j .

Dix modèles indépendants de chaque fragment sont générés par le logiciel DAMMIN sans imposer de symétrie. Les modèles finaux de chaque construction sont obtenus par la superposition de ces dix reconstructions indépendantes avec les programmes DAMAVER (Volkov et Svergun, 2003) et SUPCOMB 2.0 (Kozin et Svergun, 2001).

3.8 Dichroïsme Circulaire.

Un appareil Jasco-8100 équipé d'un système de thermostatisation par effet Peltier et une cuve en quartz de 0.1 cm ont été utilisés pour les mesures. Une solution de CC2D1A (sauvage et mutant) purifiée (à X et X

mg/mL respectivement) dans un tampon 25 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl est utilisée pour les mesures. Le spectre est réalisé à 293 K, de 200 à 260 nm et ramené en unité d'ellipticité molaire par résidu (unité : $\text{deg. cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) selon la formule suivante : $[\theta]_{\text{MRW}} = \theta_d / (c * l * n)$ avec n le nombre de résidus de la protéine, l la largeur de la cuvette et c la concentration de l'échantillon. θ est exprimé en millidegrés. Les courbes de dénaturation sont réalisées sur les mêmes échantillons, de 293 K à 393 K, par incréments de 1 K. La correction du signal lié au solvant est faite à partir d'un spectre du tampon dilué à 293 K seulement.

3.9 Thermoshift Assay.

Les mesures de stabilité ont été réalisées avec un échantillon purifié de LgD₃₅₈₋₈₁₆ à environ 28 μM , dans un tampon 20 mM Tris pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, ainsi qu'une solution diluée 5x de SYPRO Orange (Invitrogen) comme décrit dans (Ericsson, Hallberg et al., 2006). Le SYPRO interagissant préférentiellement avec des régions hydrophobes de la protéine, une protéine bien repliée présentera en fluorescence un signal moindre qu'une protéine dénaturée. La solution comprenant le SYPRO est excitée à 490 nm et l'émission enregistrée à 575 nm. La température est augmentée par incréments de 1°C/min, de 25°C jusqu'à 75°C. Deux contrôles sont réalisés en l'absence de protéine et de SYPRO.

3.10 Ultracentrifugation Analytique.

La protéine LgD₅₇₅₋₈₁₆ purifiée est dialysée à pH7, pH 8 et pH9, à des concentrations variables, estimées entre 1 et 4 mg/mL : avec des fenêtres saphir, une première acquisition est réalisée à 3000 rpm, d'un spectre de longueur d'onde et un spectre de la distance radiale, à 280 nm et en utilisant les interférences. L'ultracentrifugation est réalisée à 280 nm sur la nuit, à 42000 rpm, et en utilisant les interférences. La durée des scans est de ≈ 1.5 min pour le spectre de la distance radiale à une longueur d'onde donnée et par cellule (le temps entre les scans est de ≈ 5 min pour 3 cellules à 280 nm). Les données sont traitées par le logiciel SEDFIT (collaboration C. Ebel).

3.11 Test-expression et purification de CC2D1B-FLAG en cellules de mammifères.

Des cellules HEK293 EBNA sont transfectées avec un plasmide PCAGGS codant pour la protéine CC2D1B-FLAG. Les cellules sont cultivées sur des plaques 6 puits (54 cm^2) puis transfectées à 90% de confluence sur 2 jours. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon TBS (20mM Tris pH7, 100 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 3mM β -mercaptoéthanol, 1% CHAPS) par sonication, puis incubées avec une résine anti-flag M2 (Sigma). La résine est lavée 5 fois avec un tampon TBS, puis la protéine éluée dans un tampon TBS avec une concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ de peptide FLAG.

3.12 Isothermal Titration Calorimetry.

Les données sont enregistrées à partir d'un calorimètre de type VP-ITC (Microcal LLC) à 30°C sous agitation et pour un volume de cellule de 1.4569 ml. Le fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ est purifié selon le protocole standard dans un tampon 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, dilué à une concentration finale de 5 et 35 μM dans la cellule. La molécule de myoinositol 4-phosphate (Avanti Polar Lipids ref. 117Q-0014_010)) est resuspendue dans le tampon de filtration sur gel et utilisée pour l'expérience à 200 μM dans la seringue d'injection. Les courbes isotherme ont été analysées par la suite Origin.

IV Caractérisation de la protéine CHMP2B in vitro

4.1 Préparation des liposomes (CHMP2B).

Les lipides Synthetic 1-Stearoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (SOPC) et 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoserine (DOPS) de Avanti Polar Lipids sont mélangés de façon homogène dans du chloroforme selon un ratio de 8 pour 2. La solution est évaporée et le film lipidique est resuspendu dans un tampon sans sel (20mM HEPES pH 7) à une concentration finale de 2.5 mg/ml. La solution est extrudée 15 fois à travers une membrane de polycarbonates de 200 nm (Avanti Polar Lipids) afin de produire les larges vésicules unilamellaires (LUVs). Le diamètre moyen des liposomes est estimé entre 200 et 400 nm, sur la base des mesures de DLS (Dynamic Light Scattering) et des observations en microscopie électronique.

4.2 Tests de flottation (CHMP2B).

La protéine CHMP2B, de concentration variable, est incubée sur la nuit en présence des LUVs. La solution est mélangée avec un volume équivalent d'une solution de sucrose à 80% (w/v) en présence de 20mM HEPES pH 7, ce qui conduit à une concentration finale de sucrose de 40% ainsi qu'une concentration finale de LUVs de 0.625 mg/ml. 300 μ L de cette solution forment la couche basse du gradient. 100 μ L d'une solution à 30%, 20% puis 10%, dans le même tampon, constituent les couches intermédiaires et hautes du gradient. Ce gradient est ultracentrifugé à 190000g pendant 6h à 4°C. Après ultracentrifugation, les gradients sont séparés en sept fractions. La concentration en sucrose de chaque fraction est estimée par réfractométrie ; un tiers de chaque fraction est ensuite analysé par SDS-PAGE.

4.3 Purification de MBP-CHMP2B recombinante chez E.Coli.

MBP-CHMP2B est produite dans la souche E.Coli BL21 codon plus (Invitrogen). Les cellules sont cultivées à 37°C, puis induites à une DO_{600} de 0.7 avec 0.5 mM IPTG pendant 3 heures, ou alternativement 1h avec 1 mM IPTG. Le culot est resuspendu dans un tampon de lyse (50 mM Tris-Base pH 7.4 ; 0.2M NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol, inhibiteur de protéases). Après sonication, le lysat bactérien est centrifugé pendant 30 minutes à 18000 g, puis filtré à travers une membrane de 0.2 μ M. Le lysat filtré est chargé sur une colonne d'amylose (Amersham). La résine est lavée avec un tampon de lavage (50 mM Tris-Base pH 7.4 ; 1M NaCl ; 5mM β -mercaptoéthanol), et élué avec un tampon supplémenté de 10 mM Maltose (50 mM Tris-Base pH 7.4 ; 150 mM NaCl ; 10 mM Maltose ; 5 mM β -mercaptoéthanol). Le cas échéant, les conditions de filtration sur gel ainsi que les modalités de clivage par la protéase TEV, seront discutées dans le chapitre consacré.

4.4 Purification de CHMP2B 6xHis et CHMP2B Δ C recombinante chez E.Coli.

La protéine CHMP2B, marquée en c-terminal d'une étiquette hexahémidine, est produite dans une souche BL21 codon plus chez E.Coli (Invitrogen). Les cellules sont cultivées à 37°C, puis induites à une DO_{600} entre 0.5 et 0.7 avec 1mM IPTG pendant 1h. Le culot est resuspendu dans un tampon riche en sel (50 mM Tris pH 7.4, 1M NaCl, 1M KCl), complémenté de 1 mM PMSF. Après sonication, le lysat bactérien est centrifugé pendant 30 minutes à 18000 g, puis filtré à travers une membrane de 0.2 μ M. Le lysat filtré est

chargé sur une résine de Ni-NTA Fastflow (Qiagen) préalablement équilibrée dans le tampon riche en sel. Après passage du lysat, la résine est lavée longuement avec le tampon A (50 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 15 mM imidazole). La protéine d'intérêt est éluée dans un tampon B (50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole). L'état monomérique de la protéine est ensuite évalué par une seconde étape de purification, sur colonne Superdex 75(GE Healthcare), préalablement équilibrée dans un tampon 20 mM HEPES pH 7.4, 100-300 mM NaCl : l'éluion est contrôlée à 220 nm, et la protéine élue en un pic unique correspondant à une forme monomérique et soluble.

Alternativement ce protocole peut être modifié afin de promouvoir la polymérisation de la construction. Le temps d'induction est alors ramené à 3h, et la quantité en sel des tampons de lyse et d'éluion est ramenée à 0-100 mM NaCl. La concentration de l'échantillon obtenu par colonne Vivaspin peut également déplacer l'équilibre vers la polymérisation, ce phénomène étant lui-même fortement dépendant de la concentration.

4.5 Détermination de la concentration de CHMP2B 6xhis et variants.

CHMP2B ne possède aucun des acides aminés aromatiques couramment utilisés pour évaluer la concentration d'une protéine par spectrophotométrie à 280 nm. La quantification de la concentration peut être évaluée de deux manières. La première consiste à doser l'échantillon par la méthode de Bradford, en fonction d'une courbe de calibrage évaluée sur la protéine BSA. Cette technique est complétée par une analyse sur gel SDS-PAGE, en fonction d'un contrôle BSA, en utilisant le logiciel Photoshop pour quantifier l'intensité des bandes.

4.6 Marquage de CHMP2B par Alexa-Fluo 488.

En raison des limitations dues aux faibles rendements des préparations de CHMP2B, ainsi que des difficultés à concentrer la protéine, le marquage est réalisé directement en incubant les fractions issues de la purification par résine Ni-NTA avec le marqueur Alexa-fluo 488-C5 Maleimide (Invitrogen) pendant au minimum 2 heures à température ambiante, dans des conditions non réductrices, avec un ratio Alexa : CHMP2B de 5 :1, en accord avec le protocole d'Invitrogen. La réaction est stoppée par ajout de β -mercaptoéthanol, à une concentration finale de 5 mM. L'échantillon est ensuite chargé sur une colonne Superdex 75 (GE Healthcare), préalablement équilibrée dans un tampon 20 mM HEPES pH 7.4, 0-300 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol. La protéine marquée migre de façon identique à la protéine non marquée. La fluorescence libre est séparée du reste et élue tardivement comme une protéine de 1 kDa. La présence de fluorescence dans l'échantillon est confirmée par un spectre de fluorescence dans la région d'émission du fluorophore. Le degré de marquage de l'échantillon est déterminé à partir de la formule fournie par Invitrogen :

$$\text{Rapport molaire Alexa / Protéine} = A_{494} / (71,000 \times \text{concentration en protéine (M)})$$

ou $71000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ est le coefficient d'extinction molaire de la molécule Alexa488-C5 Maleimide à 494 nm.

La concentration de la protéine CHMP2B marquée est déterminée à partir de la valeur obtenue après quantification sur gel, selon une valeur étalon définie par échantillon BSA de concentration connue.

4.7 Purification de MBP CHMP4B_{ΔC-Alix} recombinante chez E.Coli.

La protéine MBP-CHMP4B_{ΔC-Alix} a été produite à partir de la construction décrite précédemment (Pires et al., 2008), avec toutefois quelques différences notables par rapport au premier protocole. La production est réalisée en souche BL21. Les cultures sont induites à une DO₆₀₀ de 0.5-0.7, pendant 1h, soniquées en présence d'un tampon de lyse (50 mM Tris pH 7.4, 1M NaCl, 3 mM β-mercaptoéthanol, 1mM PMSF) puis centrifugées à 18000 rpm pendant 25 minutes. Le lysat est filtré à travers une membrane de 0.2 μM puis chargée sur une résine Ni-NTA superflow (Qiagen). Après passage du lysat, la résine est lavée longuement avec un tampon A (50 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 15 mM imidazole), suivi d'un second lavage à 50 mM Imidazole. La protéine d'intérêt est éluée dans un tampon B (50 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole). Les fractions d'intérêt sont recueillies dans des aliquots de 2 mL, celles les plus concentrées sont chargées directement sur colonne Superdex 200 (GE Healthcare) sans étape de concentration et le pic correspondant à la protéine d'intérêt conservé à 4°C.

4.8 Mesures d'interactions par SPR (CHMP2B).

Les mesures SPR ont été réalisées sur un instrument Biacore X (Biacore Inc.), à 25°C dans un tampon SPR (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% P20). Les puces CM5 sont couplées avec MBP CHMP4B_{ΔC-Alix} (500 RU), CHMP2B-6xHis (600 RU) ou CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ (100 RU). Les analytes (mutants CHMP2B) sont passés sur la puce CM5 à un débit de 10 μL/min, et la dissociation mesurée pendant 10 minutes. La puce est régénérée avec 50 μL à 2M NaCl à 50 μL/min. Les cinétiques d'interaction sont évaluées avec la suite logicielle BiaEvaluation (version 4.1, Biacore, Inc.) en utilisant le modèle Langmuir 1:1 sans transfert de masse, mais corrigées pour une ligne de base fluctuante si nécessaire.

CHAPITRE III –

CC2D1A est un nouveau régulateur de polymérisation de CHMP4B.

Article 1 : CC2D1A is a new regulator of ESCRT-III CHMP4B polymer formation

Nicolas Martinelli *, Bettina Hartlieb *, Charles Sabin, Aurelien Dordor, Nolwenn Miguet, Sergiy V. Avilov, E. Ribeiro, Gregory Effantin, Guy Schoehn, M. Jamin, Heinrich Göttlinger and Winfried Weissenhorn

* : les auteurs ont contribué également
Journal of Biological Chemistry, **Soumis**.

Contexte de l'étude : la machinerie ESCRT est impliquée dans de multiples fonctions biologiques, parmi lesquelles figure la division cellulaire et la formation des corps multivésiculaires. Cette seconde fonction a également une conséquence dans l'internalisation et la dégradation sélective de certains récepteurs transmembranaires vers le lysosome. Le recrutement sélectif d'ESCRT-III, et éventuellement l'activation des protéines CHMP, vont être médiées par des protéines multiples. On a répertorié, au sein des protéines CHMP, au moins deux types d'interactions : la première fait intervenir les motifs MIM1 et MIM2, situés en c-terminal. Ces motifs vont être notamment reconnus par la protéine Alix et VPS4 (McCullough et al., 2008; Kieffer et al., 2008). Un second type d'interactions implique la partie n-terminale de CHMP6, qui est reconnue par la protéine VPS25 (Teis et al., 2008; Saksena et al., 2009). Une interaction directe entre la protéine CC2D1A et CHMP4B a été rapportée par des expériences de double-hybride (Tsang et al., 2006), mais elle n'a pas encore été confirmée. Ce nouveau régulateur potentiel d'ESCRT-III a en revanche été étudié chez la Drosophile; la protéine LgD a notamment été impliquée dans la régulation du récepteur Notch au niveau des endosomes précoces. CC2D1A appartient à une nouvelle famille de protéines mal caractérisées, impliquée dans plusieurs voies de signalisation et susceptible de jouer un rôle dans la mise en place d'ESCRT au niveau de la membrane des endosomes.

Résultats : nous confirmons in vitro l'interaction entre CC2D1A/CC2D1B et CHMP4B. CC2D1A interagit principalement par sa troisième répétition DM14, selon une stoechiométrie 1 :1, et lie CHMP4B par sa partie n-terminale. Une structure cristallographique partielle de CHMP4B a, en outre, permis d'identifier deux régions impliquées dans cette interaction. En particulier, un triple mutant CHMP4B ne liant plus CC2D1A a été identifié : cette interaction semble médiée principalement par l'extrémité c-terminale de l'hélice $\alpha 2$, ce qui constitue donc un nouveau site d'interaction, distinct de ceux déjà rapportés dans la littérature. L'introduction de ces trois mutations dans une construction tronquée en c-

terminal de CHMP4B abolit en outre son effet dominant-négatif sur le bourgeonnement du HIV (collaboration H. Gottlinger) : cette donnée suggère donc que le site d'interaction de CC2D1 est important pour la fonction de CHMP4B, et potentiellement impliqué dans la polymérisation. Nous avons confirmé cette hypothèse *in vitro* en montrant que l'interaction de CC2D1A avec CHMP4B prévient la polymérisation de ce dernier, contrairement à une forme mutée de CC2D1A ne liant plus CHMP4B. Les implications de cette découverte *in vivo* sont également discutées.

Contribution personnelle : la troisième répétition DM14 de CC2D1A avait été impliquée dans l'interaction avec CHMP4B par le Dr Hartlieb. Sur la base de la structure cristallographique de CHMP4B, j'ai pu mettre en évidence trois résidus impliqués de façon majeure dans l'interaction avec CC2D1A. Réciproquement, je mets en évidence sur CC2D1A une région importante pour cette interaction. Je montre en outre que ce site d'interaction est impliqué dans la polymérisation de CHMP4B et, sur la base des données biochimiques et la structure cristallographique du fragment CHMP4B 23-97, que CC2D1A agit *in vitro* comme un inhibiteur de polymérisation.

CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B polymer formation

Nicolas Martinelli^{1,4}, Bettina Hartlieb^{1,4}, Yoshiko Usami², Charles Sabin¹, Aurelien Dordor¹, Nolwenn Mignet¹, Sergiy V. Avilov^{1,3}, Euripedes A. Ribeiro Jr¹, Heinrich Göttlinger² and Winfried Weissenhorn^{1,5}

¹Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Program in Gene Function and Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

³European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, BP181, 38042 Grenoble Cedex 9, France

⁴These authors contributed equally

⁵Corresponding author: Winfried Weissenhorn, e-mail: weissenhorn@embl.fr

Tel: 33-476-207281 Fax: 33-476-209400

Running title: CC2D1A-CHMP4B interaction

Keywords: CC2D1A, FREUD-1, Aki-1, LgD, ESCRT, CHMP4, HIV-1, budding

Background: ESCRT-III regulates late steps in MVB biogenesis, enveloped virus budding and cytokinesis

Results: CC2D1A is shown to interact with the helical hairpin of ESCRT-III CHMP4B and prevents CHMP4B polymerization *in vitro*.

Conclusions: CC2D1A might act as a negative regulator of ESCRT-III CHMP4 B function.

Significance: Our findings highlight a new role for CC2D1A and B in the regulation of ESCRT-III.

Introducing these mutations into a C-terminal truncation of CHMP4B that exerts a potent dominant negative effect on HIV-1 budding, revealed that one of the mutants lost this effect completely. This suggests that the identified CC2D1A binding surface might be required for CHMP4B polymerization, which is consistent with the finding that CC2D1A binding to CHMP4B prevents CHMP4B polymerization *in vitro*. Thus CC2D1A might act as a negative regulator of CHMP4B function at cellular membranes.

Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) regulate diverse processes ranging from receptor sorting at endosomes to distinct steps in cell division and budding of some enveloped viruses. Common to all processes is the membrane recruitment of ESCRT-III that leads to membrane fission. Here we show that CC2D1A is a novel regulator of ESCRT-III CHMP4B function. We demonstrate that CHMP4B interacts directly with CC2D1A and B with nanomolar affinity by forming a 1:1 complex. Deletion mapping revealed a minimal CC2D1A CHMP4B binding construct, which includes a short linear sequence within the third DM14 domain of CC2D1A. The CC2D1A binding site on CHMP4B was mapped to the N-terminal helical hairpin. Based on a crystal structure of the CHMP4B helical hairpin two surface patches were identified that interfere with CC2D1A interaction as determined by SPR.

Introduction

The coiled coil and C2 domain containing proteins A and B (CC2D1A, CC2D1B) are evolutionary conserved proteins that contain four drosophila melanogaster 14 domains (DM14) of unknown function followed by a C2 domain. CC2D1A and B are also known as Akt kinase interacting protein 1(Aki-1), Five prime Repressor Under Dual repression binding protein 1 (Freud-1 and 2) and Tank-binding kinase 1 (TBK-1) associated protein in endolysosomes (TAPE). The emerging picture for CC2D1 function suggests that it acts as a scaffold protein that touches and/or connects several distinct cellular functions. CC2D1A was initially reported to function as activator of NF- κ B (1) and as transcriptional repressor of the serotonin-1A receptor gene (2,3); its deregulation was associated with major depressive disorder (4). Furthermore, a C-

terminal deletion in the CC2D1A gene has been linked to nonsyndromic mental retardation (5).

Besides transcriptional regulation, CC2D1A (TAPE, Aki-1) has been implicated in different signaling pathways including the TBK1, NF- κ B and ERK pathways that regulate immunity, inflammation and cell survival (6,7) and the PDK1/Akt (phosphatidylinositol-2-OH/3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1-Akt) pathway in EGF signaling (8) associated with cell survival and cell cycle progression.

A direct role in cell division is suggested by the CC2D1A (Aki-1) association with centrosomes and regulation of centriole cohesion (9). Its function during mitosis is further controlled by phosphorylation (10). Consistent with a role in cell division CC2D1A (Aki1) depletion caused the formation of multipolar spindles (9,11). Interestingly, a similar phenotype was observed upon depletion of some endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) components including ESCRT-III CHMP4B (12).

ESCRT complexes 0, -I, -II, -III and the VPS4 complex catalyze multivesicular body biogenesis leading to plasma membrane receptor down regulation (13,14), and some ESCRTs are recruited during cytokinesis and enveloped virus budding (15-17). The function of ESCRT-III and VPS4 is common to all three processes and required for membrane fission (18,19). A direct link between ESCRT function and CC2D1A was proposed by the yeast two-hybrid interaction of CC2D1A and CHMP4 (20). Further evidence of an ESCRT-CC2D1A, B connection originates from studies with the drosophila homologue Lethal giant discs (Lgd) of CC2D1A which is implicated in Notch receptor signaling. In *lgd* mutant cells, Notch and other transmembrane proteins accumulate in enlarged endosomal compartments positive for Rab5, Rab 7 and the ESCRT-0 factor Hrs. This indicated that Lgd functions in endosomal trafficking downstream of Hrs (21-23).

In order to test the connection of CC2D1A and ESCRT-III we set out to analyze the structural basis of the CC2D1A interaction with ESCRT-III CHMP4. We show that only one DM14 domain is required for the interaction with C-terminally truncated CHMP4B and identify the interaction surface by site directed mutagenesis. CC2D1A co-purification with truncated forms of CHMP4B identified the requirement of the helical hairpin of CHMP4B for interaction. Isothermal titration calorimetry

of CHMP4B deletion constructs and CC2D1A mapped the binding site to the N-terminal end of the CHMP4B hairpin, whose structure was determined to 1.8Å resolution. Mutagenesis of the CHMP4B hairpin fragment confirmed this region as CC2D1A interaction site as tested by Surface Plasmon Resonance (SPR) analyses. Furthermore, we provide evidence that the CC2D1A interaction surface is important for CHMP4B polymerization and required to exert a dominant negative effect on HIV-1 budding. Because the CC2D1A-CHMP4B interaction inhibited CHMP4 polymerization *in vitro*, our data suggest further that CC2D1A might thus act as a regulator of CHMP4 polymerization.

Experimental procedures

Expression constructs - cDNA encoding CHMP4B(7-105), CHMP4B(7-110) and CHMP4B(23-97) were cloned into expression vector pBADM41 and CHMP4B mutants 1 and 2 (mut 1, R28A, R30A, D31R; mut2, E90R, E94R and E97R) were cloned into PETM41. CC2D1B_1-601 was cloned into expression vector pProEx-Htb (Invitrogen) and all other truncated CC2D1A constructs were cloned into the expression vector PET28-his₆-TEV (kindly provided from N. Tarbouriech). The CC2D1A(346-455) mutant (K374A, R376A, R380A, K383A, D387A, R390A, K393A) was cloned in pProEx-Htb (Invitrogen) and cDNA carrying the CC2D1A mutations were synthesized by Genscript Inc.

Protein purification - MBP-CHMP4B $_{\Delta C-Alix}$ was produced as described previously (24). The monomeric protein was separated from polymeric CHMP4B by gel filtration on a Superdex 200 column (GE Healthcare) in a buffer containing 20 mM Tris pH 7.4 100 mM NaCl.

MBP-CHMP4B(7-105) constructs (mutant and wild type) were transformed into BL21 cells, grown at 37°C to an OD of 0.6 and protein expression was induced with 1mM IPTG. Cultures were grown for 1h, centrifuged, and the pellet resuspended in lysis buffer A (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, EDTA-free protease inhibitors) before sonication. After a second step of centrifugation, the supernatant was filtered and loaded onto an amylose column. The resin was washed with lysis buffer containing 1M NaCl and 1M KCl, and eluted in 50 mM Tris pH 7.4, 350 mM NaCl, 10 mM Maltose. Further purification was achieved on a Superdex 200

column (GE Healthcare) in buffer B, 25 mM Tris pH 7.4 100 mM NaCl.

CC2D1A constructs were expressed in BL21, induced with 1 mM IPTG and grown for 3 hours at 37°C. The pellet was resuspended in buffer A, sonicated and the supernatant was filtered and loaded onto a Ni-NTA (Qiagen) resin. The column was washed with buffer A supplemented with 1M NaCl and subsequently with buffer C, 50 mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 50 mM imidazole. The protein was eluted in 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazole. The 6x-histidine tag was removed with TEV protease at a ratio of 2 µg for 1 mg of protein overnight at 4°C. The processed protein was dialyzed against 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole, loaded on a Ni-NTA resin and the flow-through collected. CC2D1A was further purified on a Superdex 75 column (GE Healthcare) in buffer B.

Complex formation of CC2D1A/B with CHMP4B - CHMP4B(7-105), CHMP4B(23-97) or CHMP4B(7-110) were transformed into BL21 cells and grown from 1L flasks at 37°C until an OD of 0.6 was reached, and induced with 0.2% (w/v) arabinose. Cultures were grown for 1h, centrifuged, and the pellet resuspended in lysis buffer D (50mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM β-ME, EDTA-free protease inhibitors) before sonication. After centrifugation, the supernatant was filtered and loaded on a Ni-NTA resin, washed with buffer E (buffer D supplemented with 1M NaCl- and 1M KCl) and buffer D plus 50 mM imidazole. The purified CC2D1A or B proteins were loaded onto the Ni-resin containing MBP-CHMP4B. Unbound CC2D1A/B protein was washed off from the column in buffer D and the complex was eluted with buffer D plus 250 mM Imidazol. MBP was removed from CHMP4B by TEV protease cleavage at a ratio of 2 µg for 1 mg of protein overnight at 4°C. The complex was dialyzed against 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM β-ME and loaded on a Ni-NTA resin connected to an Amylose column. The CC2D1A/B-CHMP4B complex was in the flow-through further purified on a Superdex 75 (GE Healthcare) column in buffer C. Further purification of the CC2D1A/B and CHMP4B complexes on an S sepharose column in buffer E (25 mM NaCitrate, pH 5.5, 50 mM NaCl) and elution in buffer E supplemented with 1 M NaCl

dissociated the complex and both CC2D1A/B and CHMP4B proteins eluted in separate peaks.

Co-purification experiments - Constructs corresponding to wild type and mutant (mut1, mut2, mut1.2) MBP-CHMP4B(7-105) were transformed into BL21 cells and grown from 1L flasks at 37°C until an OD of 0.6 was reached, and induced with 0.2% (w/v) arabinose (for the wild-type construct), or 1mM IPTG for the mutants. Cultures were grown for 2h, centrifuged, and the pellet resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF) before sonication. After centrifugation, the supernatant was filtered and loaded on an Amylose column. The resin was washed with 5 column volumes of washing buffer (20 mM Tris pH 7.4, 1M NaCl) and then equilibrated with the running buffer (20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl). CC2D1A(346-455) was purified separately on a Ni-NTA column as described above. 3 mg of His-tagged CC2D1A(346-455) was incubated with wild type and mutant MBP-CHMP4B(7-105) bound to the amylose resin for 30 minutes and washed with 5 column volumes of running buffer. MBP-CHMP4B(7-105) wild type and mutants were eluted with a buffer containing 20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 20 mM Maltose and the presence of CC2D1A(346-455) was confirmed by SDS-PAGE.

MBP pulldown experiments - 30 µL amylose resin (NEB) were incubated with an excess of monomeric MBP-CHMP4B 7-105 for 30 minutes at room temperature, except for controls. Unbound MBP-CHMP4B was removed with three washing steps with buffer (25 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl). The matrices were incubated with similar amounts of CC2D1A 346-455 wild-type and mutant, in 5-fold molar excess for 1 hour at room temperature. Unbound CC2D1A was removed by five washing steps in buffer. Bound proteins on matrix were resuspended in SDS-loading buffer; a third of each sample was analyzed by SDS-PAGE and bands were detected by Coomassie Blue Staining.

Sedimentation experiments - Monomeric MBP-CHMP4B_{ΔC-Alix} (1.5 µM) was concentrated to a final concentration of 15 µM in presence of a 5-molar excess of CC2D1A wild-type or mutant; subsequently, MBP was removed by TEV protease cleavage overnight at 4°C at a ratio of

1:10 (w/w) to induce polymerization. The protein(s) were then separated on sucrose gradients in HBS buffer (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl), by overlaying sucrose solutions of 60% (65 μ L), 40% 30%, 20% and 5% (85 μ L each). Centrifugation was performed in a Beckman SW55 rotor at 40000 rpm for 6h at 4°C. Fractions from the gradients were analyzed on a 15% SDS-PAGE and bands detected with Coomassie Blue staining.

Isothermal titration calorimetry - Calorimetric measurements were carried out at 25°C using a VP-ITC instrument with a cell volume of 1.4569 ml (MicroCal, LLC). CC2D1B 1-601, CC2D1A-constructs and CHMP4B(7-107) or CHMP4B(23-97) were exchanged in the same batch of buffer (50 mM Citrate, pH 6, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP) by extensive dialysis. The same batch of buffer was used for further dilutions of the proteins. The protein concentrations used in the cell or in the syringe are indicated in table 2. The solution in the cell was stirred at 286 rpm to ensure rapid mixing. The interaction isotherms were analyzed using Origin software package supplied by MircoCal. An interaction model assuming n independent and equivalent binding sites was applied, and the stoichiometry n , change in enthalpy ΔH , and binding constant K_a were iteratively fitted.

SEC-MALLS- Size exclusion chromatography (SEC) combined with detection by multi-angle laser light scattering (MALLS) and refractometry - SEC was performed with a Superdex S200 column (GE Healthcare) equilibrated in a buffer containing 25 mM Tris (pH 7.5), 100 mM NaCl, 3 mM β -ME. Separations were performed at 20°C with a flow rate of 0.5 ml/min. 50 μ l of the complexes as indicated were injected at a concentration of 4 mg/ml. MALLS detection and data analysis was performed as described (25).

Surface Plasmon resonance - BIAcore measurements were performed with the Biacore X instrument (BIAcore, Inc.) at 25°C in running buffer (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% Surfactant P20). A CM5 chip was coated with CC2D1A(346-455) to a target of \sim 100 Response units (RU). The analytes MBP-CHMP4B(7-105) wild type and mutants (in running buffer) were passed over the chip surface at concentrations ranging respectively from 0.47 μ M to 0.062 μ M and 1.4 μ M to 0.525 μ M for 5 minutes at a flow rate of

10 μ l/min and dissociation was recorded during 10 minutes. The chip was regenerated with 10 μ l of 1 M NaCl at 50 μ l/min. Binding kinetics were evaluated using the BiaEvaluation software package (BIAcore, Inc.) using a Langmuir model 1:1 with no mass transfer, but corrected for a drifting baseline when necessary.

Crystallization and structure solution of CHMP4(23-97)- CHMP4B(23-97) crystals were obtained by the vapor diffusion method in hanging drops mixing equal volumes of complex and reservoir solution (0.1 M Bis-Tris pH 5.5, 0.2 M KCL, 19% PEG 3350 (w/v)). The crystal was cryo-cooled at 100 K in reservoir buffer containing 25% (v/v) glycerol. The selenomethionin substituted CHMP4B(23-97) was crystallized under the same conditions. A complete dataset was collected at the ESRF (Grenoble, France) beam line ID14-4. Data were processed and scaled with MOSFLM (26) and SCALA (27,28). The crystals belong to space group $P2_12_12_1$ with unit cell dimensions of $a=37.59$ Å, $b=71.44$ Å, $c=123.64$ Å and contain 4 molecules per asymmetric unit. The structure was solved by the single anomalous dispersion method employing the data set collected at the peak wavelength. The structure was solved using the SAS protocol of Auto-Rickshaw (29). FA values were calculated using the program SHELXC (30). All 4 heavy atoms positions were localized using the program SHELXD (31) and the correct hand for the substructure was determined using the programs ABS (32) and SHELXE (33). Initial phases were calculated after density modification using the program SHELXE (33). The initial phases were improved using density modification and phase extension to 1.80 Å resolution using the program RESOLVE (34). An initial model was build with ARP/WARP (35) and completed by several cycles of manual model building with COOT (36) and refinement with REFMAC (37) using data to 1.8 Å resolution to an R_{factor} of 0.22 and R_{free} of 0.28 (Table 1). The final model contains chain A residues 19 to 97, chain B residues 19 to 97, chain C residues 19 to 96 and chain D residues 21 to 97 (residues 19, 20, 21 and 22 derive from the expression vector). 99.6 % of the residues are within the most favored and allowed regions of a Ramachandran plot (28). Molecular graphics figures were generated with PyMOL (W. Delano; <http://www.pymol.org>) and sequence alignments with the ESPript (38). Coordinates and structure factors have been

deposited in the Protein Data Bank with accession ID 4abm.

Mammalian expression and immunolocalization - CHMP4B(1-153)-flag and mutated forms carrying the mut1, mut2 and mut1.2 surface patch mutations were expressed in HEK293 cells. 15 h after transfection cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with a polyclonal anti-flag AB (Sigma) followed by an anti-rabbit Alexa 594 labeled (Invitrogen) antibody. After antibody incubation, slides were washed with PBS, mounted in Mowiol and analyzed by confocal microscopy. Microscopy was performed using the TCS SP2 AOBS confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Germany), with HCX Plan-Apochromat 63x 1.4 oil immersion objective; excitation and emission were set at 405 and 420-470 nm for DAPI staining, at 488 and 500-550 nm for Alexa 488 antibody staining. Signals in different colour channels were acquired sequentially. Brightness and contrast of raw images were optimized for presentation purpose.

HIV budding - 293T cells (1.2×10^6) were seeded into T25 flasks and transfected 24 hr later using a calcium phosphate precipitation technique. The cultures were transfected with 1 μ g HXBH10, which encodes WT HIV-1, together with CHMP4B₁₋₁₅₃FLAG wild type or mutants CHMP4B_{mut1}, CHMP4B_{mut2} and CHMP4B_{mut1.2} (100 ng each). The total amount of transfected DNA was brought to 8 μ g with carrier DNA (pTZ18U). Twenty-four hr post transfection, the cells were lysed in RIPA buffer (140 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS), and the culture supernatants were clarified by low speed centrifugation and passaged through 0.45- μ m filters. Virions released into the medium were pelleted through 20% sucrose cushions and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-HIV CA antibody 183-H12-5C (39). Proteins in the cell lysates were detected by Western blotting with anti-HIV CA or anti-FLAG antibody M2 (Sigma).

Results

CC2D1A recruits CHMP4B *in vitro*.

A yeast two hybrid screen identified CC2D1A and CC2D1B as potential binding partners of CHMP4A, B and C (20). In order to confirm the yeast two hybrid results we set out to determine the direct interaction of CC2D1A or B and CHMP4B. Although attempts to express full length CC2D1A or B in *E. coli* failed, a C-terminal deletion of CC2D1B, which lacks the C2 domain, CC2D1B(1-601) (**Figures 1A and B**) could be expressed and co-purified with MBP-CHMP4B Δ C (24). Both proteins eluted in the same peak from a size exclusion chromatography (SEC) column (**data not shown**). However, removal of MBP from CHMP4B Δ C by TEV protease cleavage induced aggregation of the complex. The same construct corresponding to CC2D1A was poorly expressed and not soluble. In order to enhance the solubility of the complex a smaller CHMP4B fragment containing residues 7-110 was identified by limited proteolysis with trypsin and MBP-CHMP4B(7-110) was cloned and expressed. MBP-CHMP4B(7-110) formed a complex with CC2D1B(1-601), which stayed monodisperse after removal of MBP. SEC in combination with MALLS analysis indicated a 1:1 binding stoichiometry based on the \sim 80 kDa molecular weight of the complex (**Figure 1C**), which is close to the calculated molecular weight of 76,4 kDa for a 1:1 complex (calculated MW of CC2D1B(1-601) is 64,6 kDa and of CHMP4B(7-110) is 12 kDa. The 1:1 stoichiometry was further confirmed by isothermal titration calorimetry (ITC), which revealed a K_d of 382 nM for the CC2D1B(1-601)-MBP-CHMP4B(7-110) interaction (**Figure S1 and Table 1**).

In order to further define the CHMP4B interaction site on CC2D1A, we designed several deletion constructs of CC2D1A (**Figure 1B**) and tested the interaction with CHMP4B(7-110) by size exclusion chromatography (data not shown), ITC or MALLS (**Figures S1 and S2**). This demonstrated that the third DM14 domain and the region connecting to the fourth DM14 domain are required for interaction. ITC and MALLS confirmed the 1:1 stoichiometry for CHMP4B binding to the minimal binding construct CC2D1A(346-455) (**Figures 1D and S1**). However, ITC also indicated small differences regarding the individual K_d s. CC2D1A(309-494) produced a K_d of 351 nM, which is comparable to CHMP4B(7-110) binding to CC2D1B(1-601) (K_d =382 nM).

Shortening the N-terminus further as in CC2D1A(346-494) reduced the K_d 2-fold to 719 nM. In contrast, the C-terminal truncation of CC2D1A(346-494) to CC2D1A(346-455) produced a similar K_d as observed for CC2D1A(346-494) (Table 1). Further truncations such as CC2D1A(291-416), which is short of the region C-terminal of the third DM14 domain and CC2D1A(416-455), which lacks the third DM14 domain did not produce complexes as analyzed by SEC and ITC (data not shown). We conclude from these experiments that amino acids 346 to 455, which include the third DM14 domain, contain the main binding site for C-terminally truncated CHMP4B.

In order to map the CHMP4 binding site on CC2D1A, we compared sequences from different species of CC2D1A and B comprising the minimal CHMP4 binding region (residues 346-455) as determined by SEC and ITC. Because both CC2D1A and B bind to CHMP4B, we designed a mutant of CC2D1A(346-455) based on sequence conservation. CC2D1A_mut has 7 conserved residues changed to Ala (Figure S3). The mutant protein was soluble and the interaction was tested with MBP-CHMP4B(7-105). While wild type CC2D1A(346-455) was able to pull-down CHMP4B(7-105) as expected from the ITC measurements, CC2D1A_mut did not interact with CC2D1A in this assay (Figure 2E). We conclude from these experiments that the linear sequence within CC2D1A residues 374-393 (Figure S3) is important, implicating the third DM14 domain in CHMP4B binding.

We tested next whether truncations of both helices of the CHMP4B helical hairpin to residues 23 to 97 affects CC2D1A binding. CHMP4B(23-97) still interacted with CC2D1A(346-455) as determined by SEC (data not shown). However, ITC measurements indicated a ~ ten-fold lower K_d of 5.5 μ M (Figure S1 and Table 1). This suggests that the N- and C-terminal end of the CHMP4B hairpin are either important for CC2D1A interaction or for the stability of the helical hairpin.

Crystal structure of CHMP4B(23-97)

We tested all complexes formed between CC2D1A or 1B and CHMP4B in crystallization trials, but failed to obtain crystals of the complex. However, in one of the crystallization trials performed with the complex of CC2D1A(346-455) and CHMP4B(23-97), CHMP4B(23-97) crystallized on its own. The structure was solved from a selenomethione

substituted crystal using the single wavelength anomalous dispersion method and diffraction data to 1.8 Å resolution (Table 2), which resulted in a readily interpretable electron density map (Figure 2A). The asymmetric unit contained 4 molecules forming identical ~64 Å long helical hairpins composed of $\alpha 1$ residues 23-58 and $\alpha 2$ residues 61-97 (Figure 2B). $C\alpha$ superpositioning of the main chain atoms of CHMP4B with the main chain of CHMP3 results in an r.m.s.d of 2.68 Å (Figure 2C) and with the main chain of IST1 in an r.m.s.d of 3.32 Å (figure 3D). Likewise part of α helix 1 from yeast Vps20 (CHMP6) fits $\alpha 1$ from CHMP4 with an r.m.s.d. of 0.68 Å (Figure 2D). This corroborates the structural similarity of CHMP proteins despite their low sequence conservation (Figure S4).

Mapping of the CC2D1A binding site on CHMP4B.

We focused our mutational analyses to map the CC2D1A binding site to the N- and C-terminal ends of the helical hairpin for the following reasons. First, deletion of the N- and C-terminal ends of CHMP4B(7-110) that produced CHMP4B(23-97), induced a 10-fold reduction in affinity for CC2D1A. Second, all CHMP4B-CC2D1A complexes were disrupted by high salt treatment indicating a potential role for charged interactions. Third, charged residues for mutagenesis were further chosen based on sequence conservation, taking into account that only CHMP4 isoforms interact with CC2D1A or B (Figure S4). Fifth, mapping of the charged residues on the helical hairpin structure revealed one side of the molecule that contains a cluster of acidic and basic residues at the N- and C-terminal ends of the hairpin, while the opposite side is largely uncharged (Figure 3A). Based on these observations, we designed three sets of mutants of CHMP4B(7-105), one containing amino acid changes within $\alpha 1$, CHMP4B_{mut1} (R28A, R30A, D31R, E33R), one with amino acid changes within $\alpha 2$, CHMP4B_{mut2} (E90R, E94R, E97R) and the double mutant CHMP4B_{mut1,2}. Co-purification of CC2D1A(346-455) and wild type or mutant (mut1, 2, 1.2) MBP-CHMP4B(7-105) demonstrated that both wild type and mutant MBP-CHMP4B(7-105)_{mut1} pulled down CC2D1A(346-455). In contrast, MBP-CHMP4B(7-105)_{mut2} and MBP-CHMP4B(7-105)_{mut1,2} no longer interacted with CC2D1A(346-455) (Figure 3B). This interaction pattern was confirmed by SPR. Wild type

CHMP4B(7-105) produced a K_D of 320 nM (**Table 3 and Figure S5**) similar to the affinity measured by ITC (**Table 1**). In contrast, CHMP4B(7-105)_{mut1} showed only a ~4.5-fold reduced K_D , while CHMP4B(7-105)_{mut2} and CHMP4B(7-105)_{mut1.2} did no longer interact with CC2D1A (**Table 3 and Figure S5**). We conclude that a charged surface patch on α helix 2 (E90, E94 and E97) is important for binding and that neighboring charged residues within helix 1 (R28, R30, D31, E33) contribute to CC2D1A interaction.

CC2D1A binding to CHMP4B prevents CHMP4B polymerization *in vitro*.

We have previously shown that C-terminally truncated CHMP4B, MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX} can form polymers *in vitro* (24). In order to test whether CC2D1A interferes with CHMP4B polymerization, MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX} alone and MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX} in complex with CC2D1A(346-455) were cleaved with TEV protease and analyzed by sucrose gradient density centrifugation. This showed that CC2D1A alone is found in the upper fractions of the gradient (**Figure 4A**) while MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX} alone forms monomers and high molecular weight polymers present in the lower fraction (**Figure 4B**). When MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX} is cleaved with TEV protease the monomers shift into the polymer fraction (**Figure 4C**). However, if MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX} is incubated with CC2D1A(346-455) prior to TEV protease cleavage, approximately half of monomeric CHMP4B _{Δ C-ALIX} stays monomeric and floats together with CC2D1A(346-455) in the upper fraction of the gradient, while the other half of CHMP4B _{Δ C-ALIX} polymerizes and is found in the bottom of the gradient (**Figure 4D**). When the same experiment is performed with CC2D1A_{mut} that no longer interacts with CHMP4B (**Figure 1E**), monomeric CHMP4B _{Δ C-ALIX} is no longer rescued by CC2D1A and all of cleaved CHMP4B _{Δ C-ALIX} is found in the bottom fraction of the gradient (**Figure 4E**). Because CC2D1A is never found in the bottom fraction together with CHMP4B _{Δ C-ALIX} polymers, it indicates that CC2D1A does not interact with CHMP4B polymers. We confirmed this by incubating CC2D1A(309-494), which migrates in the upper fraction of a sucrose gradient (**Figure 4F**) with CHMP4B _{Δ C-ALIX} polymers. Again CC2D1A is not found in the bottom fraction, indicating that it does not interact with CHMP4B polymers (**Figure 4G**). These results indicate that the

CC2D1A binding site is not accessible on CHMP4 filaments and that CC2D1A prevents CHMP4B polymerization *in vitro*.

The CHMP4B mutations affect HIV-1 budding.

In order to test whether the mutation of the CC2D1A binding site on CHMP4B affects HIV-1 budding, the CHMP4B mutations (mut1, mut2, mut1.2) were introduced into CHMP4B(1-153)-flag, which was shown to exert a dominant negative effect on HIV-1 budding when expressed in HIV-1 producing 293T cells (40). As expected wild type CHMP4B(1-153)-flag inhibited HIV-1 release efficiently in comparison to the vector control (**Figure 5A**). Similarly, expression of CHMP4B_{mut1} (mut1; R28A, R30A, D31R, E33R) is still dominant negative albeit slightly reduced (**Figure 5A**) while CHMP4B_{mut2} (mutation 2, E90R, E94R, E97R) has lost its dominant negative effect completely (**Figure 5A**). As expected the double mutant CHMP4B_{mut1.2}, behaved like CHMP4B_{mut2} and is no longer dominant negative (**Figure 5A**). Consistent with the release pattern, wild type CHMP4B(1-153), and CHMP4B_{mut1} revealed the intracellular accumulation of the Gag cleavage intermediates CAp2 and p41 (**Figure 5B, left panel, lanes 1 and 2**), which are characteristic for late assembly defects (41,42). These results indicate that the acidic Mut2 patch on helix 2 is required for the dominant negative effect of CHMP4, while the surface patch of Mut1 seems to be less important.

We next compared the cellular localization of CHMP4B(1-153)-flag and its mutated forms in order to test whether localization correlates with the propensity to block HIV-1 budding. Confocal microscopy imaging revealed that a substantial amount of CHMP4B(1-153)-flag as well as CHMP4B_{mut1} and CHMP4B_{mut2} localize along the plasma membrane (**Figures 6A-C**). In contrast CHMP4B_{mut1.2}, which is no longer dominant negative during HIV-1 budding, reveals dramatically reduced plasma membrane localization and is mostly cytosolic (**Figure 6D**). This thus indicates that the mut1.2 surface patch is required for membrane targeting that might induce polymerization *in vivo*. To test the effect of the mut1.2 surface patch on polymerization, we mutated the surface of MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX}, which forms polymers *in vitro* (24). Sucrose gradient analyses of wild type MBP-CHMP4B _{Δ C-ALIX} and the mutated form (mut1.2) demonstrates that the wild type forms monomers detected in

the top fraction of the gradient and polymers detected in the bottom fraction of the gradient as expected (24) (**Figure 6E**). In contrast the mutated form of MBP-CHMP4B_{ΔC-Alix} is monomeric and only found in the upper fraction of the gradient (**Figure 6E**). We thus conclude from the immunolocalization data and the *in vitro* polymerization of CHMP4B that the surface patch of mut1.2 plays a role in CHMP4B polymerization.

Discussion

CC2D1A and B have been linked to a wide variety of cellular processes including transcriptional control (2,3), signaling pathways (1,6-8) centriole regulation (9), cell division (9,11) and endosomal sorting (21-23). Here we show that CC2D1A and B serve as adaptor proteins for ESCRT-III CHMP4B as previously indicated by yeast-two hybrid analyses (43). A direct interaction was confirmed *in vitro* employing recombinant CC2D1A and B and CHMP4B. CHMP4 interaction requires the third DM14 repeat to form a 1:1 complex with nanomolar affinity. Although CC2D1A has four DM14 repeats, only one interacts efficiently with C-terminally truncated CHMP4B *in vitro*. We identified residues within the third DM14 domain that are essential for interaction. Notably sequence alignment of all four DM14 domains from human CC2D1A indicates that the seven residues mutated in the third DM14 domain are not strictly conserved. DM14-1 has five residues, DM14-2 two residues and DM14-4 four residues out of the seven mutated residues conserved (**Figure S6**). This thus suggests that the other domains might provide adaptor function in different pathways.

Structural analysis of a CHMP4B fragment shows that the conformation of the helical hairpin of CHMP4B is very similar to the corresponding structural fragments of CHMP3 and IST1 (44-46). Structure based mutagenesis analyses demonstrate further that the CC2D1A interaction site on CHMP4B is confined to a charged patch at one end of the helical hairpin formed mostly by α -helix 2 and some contribution from helix 1. Thus CC2D1A and B are the first CHMP4B ligands that bind to the conserved N-terminal core. Other CHMP4 ligands such as Alix and VPS4 bind to peptide motifs present at the extreme C-terminus (47,48). CHMP proteins exist in a cytosolic closed conformation and membrane targeting is thought

to activate them (40,49,50), leading to polymer formation *in vivo* and *in vitro* (24,45,51-54)(55). Modeling CHMP4B onto IST1 shows that the CC2D1A interaction surface is accessible (**Figure 2D**). Noteworthy yeast ESCRT-III Vps20 (CHMP6) employs a neighboring surface to interact with ESCRT-II Vps25 (56) (**Figure 2E**).

CHMP interaction with cellular ligands via their C-termini (48,57-60) does not affect CHMP polymerization. On the other hand, CC2D1A interaction with the helical hairpin of CHMP4B prevents CHMP4B polymerization *in vitro*. Our results indicate further that the charged surface patch at the base of the hairpin is required for CHMP4B polymerization *in vitro* and *in vivo*. One simple explanation is that CC2D1A binding sterically hinders the formation of CHMP4B polymers *in vitro*. In the context of ESCRT-III assembly, CC2D1A (or B) could then be considered as a negative regulator of CHMP4 function.

However, we cannot exclude that CC2D1A or B associates with one end of CHMP4 polymers, mimicking the Vps25-Vps20 (CHMP6) interaction that leads to Snf7 (CHMP4) polymerization (61-63). In the context of ESCRT assembly, CC2D1A (or B) could then be considered as a positive regulator of CHMP4 function. Although CC2D1A or B have not yet been directly implicated in endosomal sorting, the drosophila homologue Lgd was found at endosomes to regulate Notch receptor trafficking (21-23). Interestingly, *lgd* mutants are involved in the ligand-independent activation of the receptor Notch, a process which is disturbed in ESCRT knockdowns (64). One model was proposed where the persistence of internalized Notch at the membrane of the endosomes, prior to internalization into ILVs, was responsible for an aberrant activation. Therefore it is tempting to speculate that a lack of recruitment and/or activation of CHMP4 in the *lgd* mutant would impair proper internalization of Notch into ILVs, and thus be responsible for the observed *lgd* phenotype.

Among other processes, CHMP4 interaction might be required during CC2D1A's function at the centrosome and during cell division. Notably depletion of CC2D1A or B from cells leads to multipolar spindles (9,11) and the same phenotype is observed upon CHMP4B depletion (12). However, the exact role of ESCRTs during cell division steps other than

membrane abscission (52,65-68) has yet to be defined.

As HIV-1 budding relies on ESCRTs, (17,69-71), HIV-1 budding assays have been used to uncover new aspects of ESCRT function (15,17,69-71). Therefore we used HIV-1 to test whether the CC2D1A binding site was important for the CHMP4B function *in vivo*. CHMP4 and CHMP2 isoforms are the essential ESCRT-III players in HIV-1 release (72) and recruited late during assembly (73). Thus, not surprisingly dominant negative CHMP4B is a potent inhibitor of HIV-1 budding (74-76). The helical hairpin of CHMP4B is required to exert a dominant negative effect (40) and we show that the charged surface patch on helix 2 plays an essential role in this process. Notably, the helix 2 patch in CHMP4B (E90, E94, E97) is distinct from the recently reported patch EVLK₁₀₄₋₁₀₇ (72) which is involved in CHMP2A binding. Moreover, CHMP4A residues 1-116

overexpression leads to the formation of polymers in COS7 cells (51), which implies that such a fragment represents a minimal region for polymerization. Because there is no evidence that CC2D1A or B is recruited during HIV-1 budding, we speculate that the helix 2 mutation that abrogates the dominant negative effect as well as CC2D1A binding affects CHMP4B polymerization during HIV-1 budding, which is supported by the reduced plasma membrane localization of CHMP4B carrying the mut1.2 surface patch mutations. It thus remains to be determined how CC2D1A or B influence or control CHMP4B polymerization during other ESCRT-catalyzed cellular processes. In summary we characterized CC2D1A *in vitro* as a novel adaptor molecule for ESCRT-III CHMP4, which will help to elucidate the function of the complex during diverse cellular processes *in vivo*.

References

1. Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., and Sugano, S. (2003) *Oncogene* **22**, 3307-3318
2. Ou, X. M., Lemonde, S., Jafar-Nejad, H., Bown, C. D., Goto, A., Rogaeva, A., and Albert, P. R. (2003) *J Neurosci* **23**, 7415-7425
3. Rogaeva, A., and Albert, P. R. (2007) *Eur J Neurosci* **26**, 965-974
4. Szewczyk, B., Albert, P. R., Rogaeva, A., Fitzgibbon, H., May, W. L., Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Stockmeier, C. A., Woolverton, W. L., Kyle, P. B., Wang, Z., and Austin, M. C. (2011) *Int J Neuropsychopharmacol* **13**, 1089-1101
5. Rogaeva, A., Galaraga, K., and Albert, P. R. (2007) *J Neurosci Res* **85**, 2833-2838
6. Chang, C. H., Lai, L. C., Cheng, H. C., Chen, K. R., Syue, Y. Z., Lu, H. C., Lin, W. Y., Chen, S. H., Huang, H. S., Shiau, A. L., Lei, H. Y., Qin, J., and Ling, P. (2011) *J Biol Chem* **286**, 7043-7051
7. Zhao, M., Li, X. D., and Chen, Z. (2010) *J Biol Chem* **285**, 24372-24380
8. Nakamura, A., Naito, M., Tsuruo, T., and Fujita, N. (2008) *Mol Cell Biol* **28**, 5996-6009
9. Nakamura, A., Arai, H., and Fujita, N. (2009) *J Cell Biol* **187**, 607-614
10. Nakamura, A., Naito, M., Arai, H., and Fujita, N. (2010) *Biochem Biophys Res Commun* **393**, 872-876
11. Neumann, B., Walter, T., Heriche, J. K., Bulkescher, J., Erfle, H., Conrad, C., Rogers, P., Poser, I., Held, M., Liebel, U., Cetin, C., Sieckmann, F., Pau, G., Kabbe, R., Wunsche, A., Satagopam, V., Schmitz, M. H., Chapuis, C., Gerlich, D. W., Schneider, R., Eils, R., Huber, W., Peters, J. M., Hyman, A. A., Durbin, R., Pepperkok, R., and Ellenberg, J. (2010) *Nature* **464**, 721-727
12. Morita, E., Colf, L. A., Karren, M. A., Sandrin, V., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. (2010) *Proc Nat Acad Sci. U.S.A.* **107**, 12889-12894
13. Saksena, S., Sun, J., Chu, T., and Emr, S. D. (2007) *Trends Biochem Sci* **32**, 561-573
14. Hurley, J. (2008) *Curr Opin Cell Biol*. **20(1)**, 4-11
15. Morita, E., and Sundquist, W. I. (2004) *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 395-425
16. McDonald, B., and Martin-Serrano, J. (2009) *J Cell Sci* **122**, 2167-2177
17. Martin-Serrano, J., and Neil, S. J. (2011) *Nat Rev Microbiol* **9**, 519-531
18. Hurley, J. H., and Hanson, P. I. (2010) *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 556-566

19. Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., and Weissenhorn, W. (2011) *Trends Biochem Sci* **36**, 199-210
20. Tsang, H. T., Connell, J. W., Brown, S. E., Thompson, A., Reid, E., and Sanderson, C. M. (2006) *Genomics* **88(3)**, 333-346
21. Jaekel, R., and Klein, T. (2006) *Developmental Cell* **11**, 655-669
22. Gallagher, C. M., and Knoblich, J. A. (2006) *Dev Cell* **11**, 641-653
23. Childress, J. L., Acar, M., Tao, C., and Halder, G. (2006) *Curr Biol* **16**, 2228-2233
24. Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., Boyer, V., Sadoul, R., Forest, E., Svergun, D. I., Gottlinger, H. G., and Weissenhorn, W. (2009) *Structure* **17**, 843-856
25. Gerard, F. C. A., Ribeiro, E. d. A., Albertini, A. I. A. V., Gutsche, I., Zaccai, G., Ruigrok, R. W. H., and Jamin, M. (2007) *Biochemistry* **46**, 10328-10338
26. Leslie, A. G. W. (1992) *Jnt CCP4/ESF-EACMB. Newslett. Protein Crystallogr.* **26**
27. Evans, P. (2006) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 72-82
28. CCP4. (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 157-163
29. Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S., and Tucker, P. A. (2005) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 449-457
30. Sheldrick, G. M., Hauptman, H. A., Weeks, C. M., Miller, R., and Uson, I. (2001) in *International Tables for Macromolecular Crystallography* (Arnold, M. G. R. E., ed) Vol. F, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
31. Schneider, T. R., and Sheldrick, G. M. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1772-1779
32. Hao, Q. (2004) *J. Appl. Cryst.* **37**, 498-499.
33. Sheldrick, G. M. (2002) *Zeitschrift für Kristallographie* **217**, 644-650
34. Terwilliger, T. C. (2000) *Acta Cryst.* **D56**, 965-972
35. Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S. (1999) *Nat Struct Biol* **6**, 458-463
36. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) *Acta Crystallographica Section D* **60**, 2126-2132
37. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta Crystallographica Section D* **53**, 240-255
38. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metoz, F. (1999) *Bioinformatics* **15**, 305-308
39. Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, and S., P. (1992) *J Virol* **66**, 6547-6554
40. Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S. R., Popova, E., Palu, G., and Gottlinger, H. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19140-19145
41. Gottlinger, H., Dorfman, T., Sodroski, J., and Haseltine, W. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 3195 - 3199
42. Garrus, J., von Schwedler, U., Pornillos, O., Morham, S., Zavitz, K., Wang, H., Wettstein, D., Stray, K., Cote, M., and Rich, R. (2001) *Cell* **107**, 55 - 65
43. Tsang, H. T., Edwards, T. L., Wang, X., Connell, J. W., Davies, R. J., Durrington, H. J., O'Kane, C. J., Luzio, J. P., and Reid, E. (2009) *Hum Mol Genet* **18**, 3805-3821
44. Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006) *Dev Cell* **10**, 821-830
45. Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W. M., Uter, N. T., Myszka, D. G., Hill, C. P., and Sundquist, W. I. (2009) *Nat Struct Mol Biol* **16**, 754-762
46. Xiao, J., Chen, X. W., Davies, B. A., Saltiel, A. R., Katzmann, D. J., and Xu, Z. (2009) *Mol Biol Cell* **20**, 3514-3524
47. McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I., and Hill, C. P. (2008) *Proc Nat Acad Sci USA* **105**, 7687-7691
48. Kieffer, C., Skalicky, J. J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D. M., Kaplan, J., and Sundquist, W. I. (2008) *Dev Cell* **15**, 62-73
49. Shim, S., Kimpler, L. A., and Hanson, P. I. (2007) *Traffic* **8**, 1068-1079
50. Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H. G., Svergun, D. I., and Weissenhorn, W. (2008) *J Mol Biol* **378**, 818-827
51. Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J. E. (2008) *J Cell Biol.* **180(2)**, 389-402

52. Guizetti, J., Schermelleh, L., Mantler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Muller-Reichert, T., and Gerlich, D. W. (2011) *Science* **331**(6024), 1616-1620
53. Ghazi-Tabatabai, S., Saksena, S., Short, J. M., Pobbati, A. V., Veprintsev, D. B., Crowther, R. A., Emr, S. D., Egelman, E. H., and Williams, R. L. (2008) *Structure* **16**, 1345-1356
54. Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H. G., and Weissenhorn, W. (2008) *Science* **321**, 1354-1357
55. Bodon, G., Chassefeyre, R., Pernet-Gallay, K., Martinelli, N., Effantin, G., Lutje Hulsik, D., Belly, A., Goldberg, Y., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Schoehn, G., Weissenhorn, W., and Sadoul, R. (2011) *Journal of Biological Chemistry* **286**, 40276-40286
56. Im, Y. J., Wollert, T., Boura, E., and Hurley, J. H. (2009) *Dev Cell* **17**, 234-243
57. Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D. J., Perisic, O., Emr, S. D., and Williams, R. L. (2007) *Nature* **449**, 735-739
58. Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L., and Bell, S. D. (2008) *Science* **322**, 1710-1713
59. Stuchell-Brereton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W. I. (2007) *Nature* **449**, 740-744
60. Solomons, J., Sabin, C., Poudevigne, E., Usami, Y., Lutje Hulsik, D., Macheboeuf, P., Hartlieb, B., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2011) *Structure* **19**, 1149-1159
61. Teis, D., Saksena, S., and Emr, S. D. (2008) *Dev Cell* **15**(4), 578-589.
62. Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E., and Emr, S. D. (2009) *Cell* **136**, 97-109
63. Fyfe, I., Schuh, A. L., Edwardson, J. M., and Audhya, A. (2011) *J Biol Chem.* **286**, 34262-34270
64. Vaccari, T., Rusten, T. E., Menut, L., Nezis, I. P., Brech, A., Stenmark, H., and Bilder, D. (2009) *J Cell Sci* **122**, 2413-2423
65. Carlton, J. G., and Martin-Serrano, J. (2007) *Science* **316**, 1908-1912
66. Morita, E., Sandrin, V., Chung, H. Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. (2007) *EMBO J* **26**, 4215-4227
67. Lee, H. H., Elia, N., Ghirlando, R., Lippincott-Schwartz, J., and Hurley, J. H. (2008) *Science* **322**, 576-580
68. Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., and Lippincott-Schwartz, J. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4846-4851
69. Bieniasz, P. D. (2009) *Cell Host Microbe* **5**, 550-558
70. Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., and Göttlinger, H. (2009) *Biochem Soc Trans* **37**, 181-184
71. Weiss, E. R., and Göttlinger, H. (2011) *J Mol Biol.* **410**(4), 525-533
72. Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W. I. (2011) *Cell Host Microbe* **9**, 235-242
73. Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P. D., and Simon, S. M. (2011) *Nat Cell Biol* **13**, 394-401
74. Strack, B., Calistri, A., Popova, E., and Gottlinger, H. (2003) *Cell* **114**, 689 - 699
75. von Schwedler, U. K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D. M., Chung, H. Y., Morita, E., Wang, H. E., Davis, T., He, G. P., Cimbara, D. M., Scott, A., Krausslich, H. G., Kaplan, J., Morham, S. G., and Sundquist, W. I. (2003) *Cell* **114**, 701-713
76. Carlton, J. G., Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10541-10546

Footnotes

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0271-01) and the DFG SPP1175 (W.W.), the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (R37AI029873 to H.G.), a postdoctoral fellowship from the European Molecular Biology Organization (B.H.) and a PhD fellowship from the Région Rhône-Alpes (Cluster 10 infectiologie) (N.M.).

Acknowledgments

We acknowledge the Partnership for Structural Biology (PSB; <http://www.psb-grenoble.eu>) for access to the common platforms including the crystallization facility (J. Marquez) and the ESRF for beam time and assistance during data collection. The HIV-1 p24 monoclonal antibody (183-H12-5C) (provided by Drs. Bruce Chesebro and Kathy Wehrly) was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH.

Figure 1

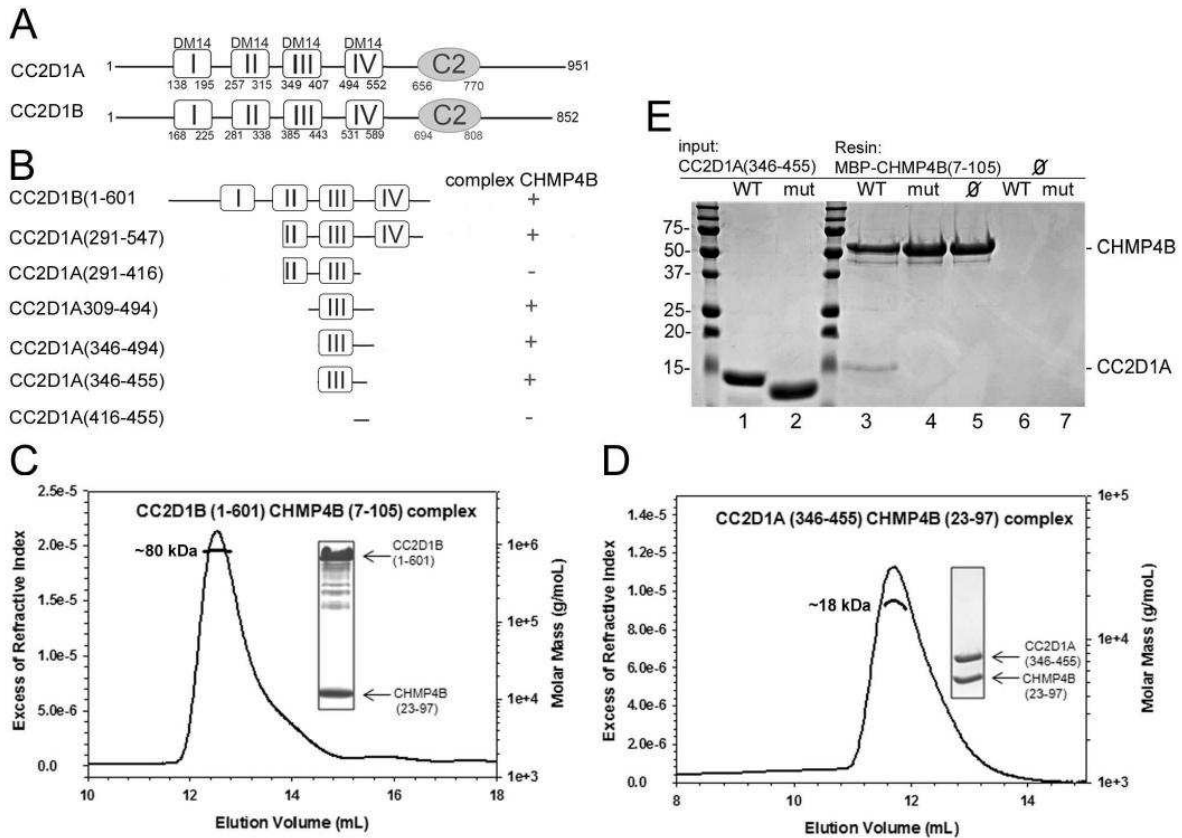


Figure 1. CC2D1B interacts with CHMP4B *in vitro*.

(A) Schematic drawing of the domain organization of CC2D1 isoforms. The upper number corresponds to the CC2D1A and the lower numbering to CC2D1B. Both isoforms contain 4 DM14 domains followed by a C2 domain.

(B) Schematic drawing of the CC2D1A and B constructs tested for CHMP4B interaction by SEC and ITC. Complex formation is indicated with a +.

(C) SEC in combination with RI (refractive index) and MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering) analyses of CC2D1B(1-601) in complex with CHMP4B(7-105) reveals a 1:1 complex. The inset shows the complex eluted from the SEC column (upper band CC2D1B(1-601) and lower band, CHMP4B(7-105)).

(D) MALLS analysis of the CC2D1A(346-455)-CHMP4B(23-97) complex shows a molecular weight of 18.2 kDa. The calculated molecular weight of the complex is 20.9 kDa.

(E) Pull down of CC2D1A(346-455) wild type and mutant (mut; CC2D1A_{mut}) by MBP-CHMP4B(7-105), shows that the CC2D1A mutations abrogate CHMP4B binding. Lanes 1 and 2 input of CC2D1A(346-455) wild type and mutant, respectively; lane 3 pull down of CC2D1A(346-455) wild type and lane 4 of the mutant; lanes 5 to 7 shows the controls, MBP-CHMP4B(7-105) alone, CC2D1A(346-455) and mutant alone. Molecular weight markers are indicated.

Figure 2

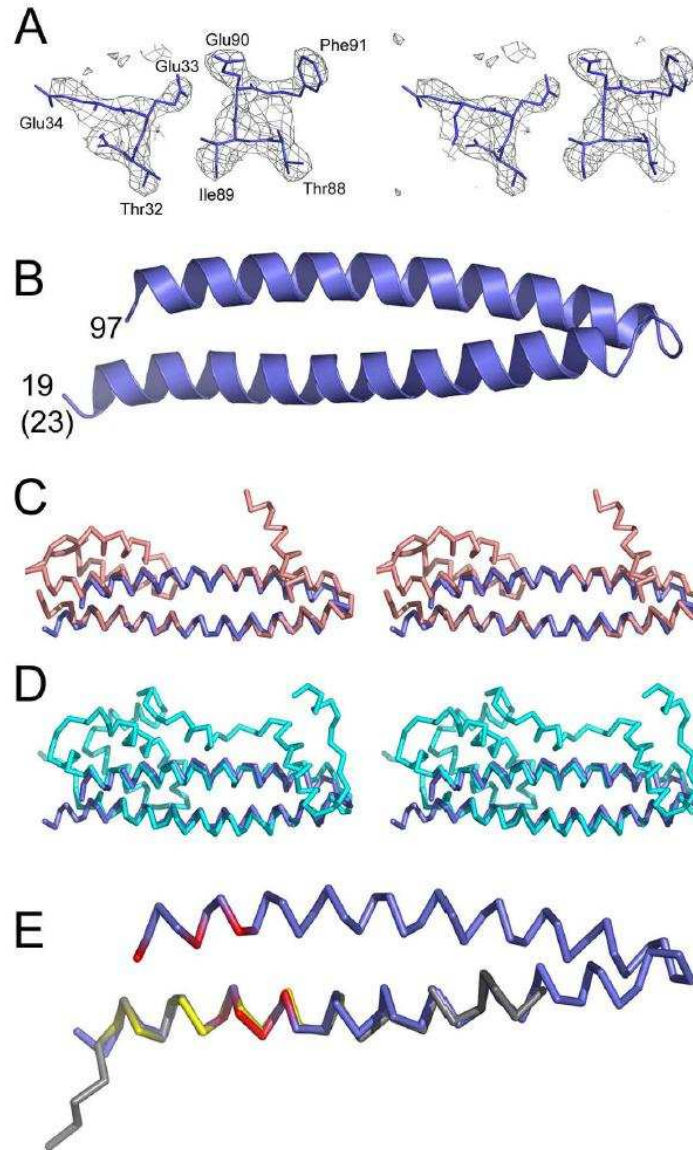


Figure 2. Crystal structure of the helical hairpin of CHMP4B.

(A) Stereo image of the electron density map calculated based on the SAD phases without density modification.

(B) Ribbon diagram of the CHMP4B helical hairpin containing residues 23-97. Note that the crystallized construct contained 4 extra residues at the N-terminus, which are in a helical conformation.

(C) Stereo images of CHMP4B (blue) and CHMP3 (salmon) (pdb 3FRT) based on superpositioning of the C α atoms.

(D) Stereo images of CHMP4B (blue), IST1 (cyan) (pdb 3FRR) and yeast Vps20 (grey) (CHMP6) (pdb 3HTU) based on superpositioning of the C α atoms.

(E) Superpositioning of the C α atoms of CHMP4B (blue) and Vps20 (grey) (CHMP6); the CHMP4B residues affecting CC2D1A interaction are labeled in red and the Vps20 residues involved in ESCRT-II Vps25 interaction are shown in yellow.

Figure 3

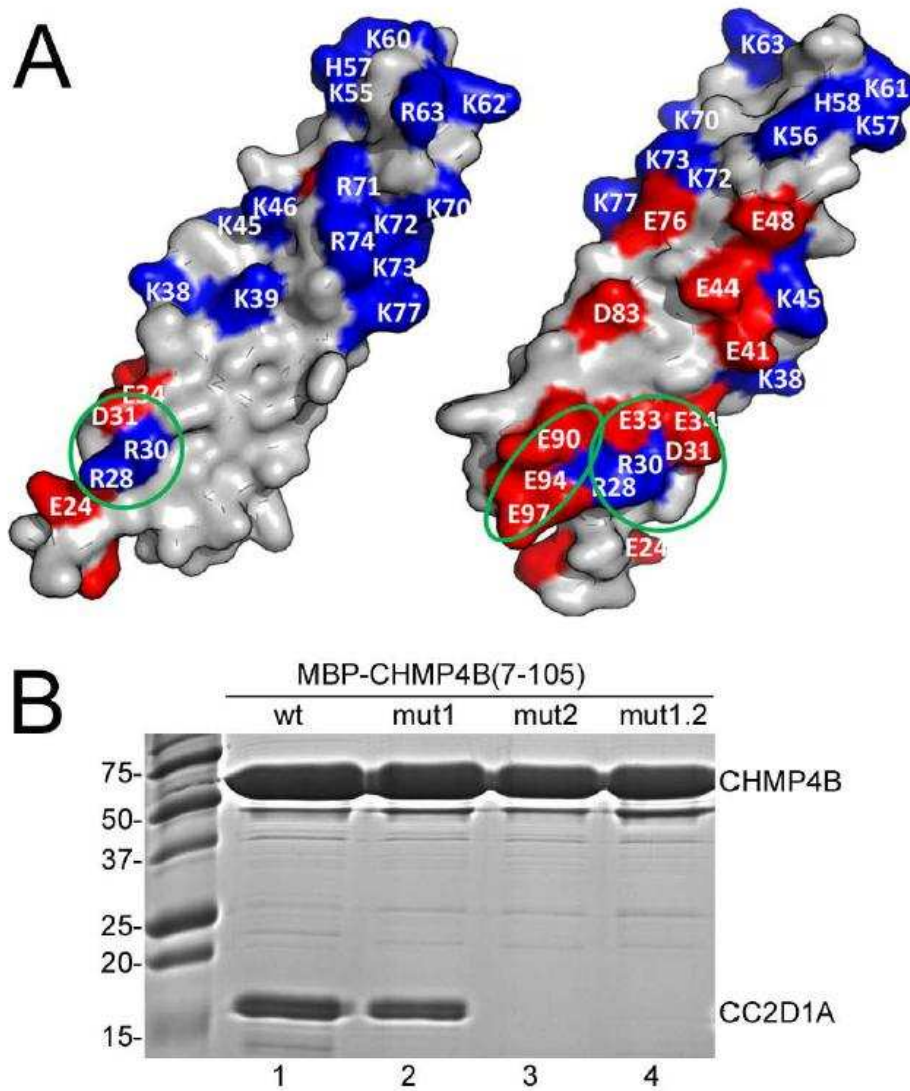


Figure 3. CC2D1A binds to the N-terminal end of the CHMP4B helical hairpin.

(A) The molecular surface of CHMP4 is shown in two orientations and charged residues are indicated. The two patches affecting CC2D1A interaction are circled in green; CHMP4B_{mut1} carries the R28A, R30A, D31R and E33R mutations and CHMP4B_{mut2} has E90R, E94R and E97R mutated.

(B) Co-purification of CC2D1A(346-455) and wild type or mutant MBP-CHMP4B(7-105); lane 1, wild type MBP-CHMP4B(7-105); lane 2 MBP-CHMP4B(7-105)_{mut1}; lane 3, MBP-CHMP4B(7-105)_{mut2}; lane 4, MBP-CHMP4B(7-105)_{mut1.2}.

Figure 4

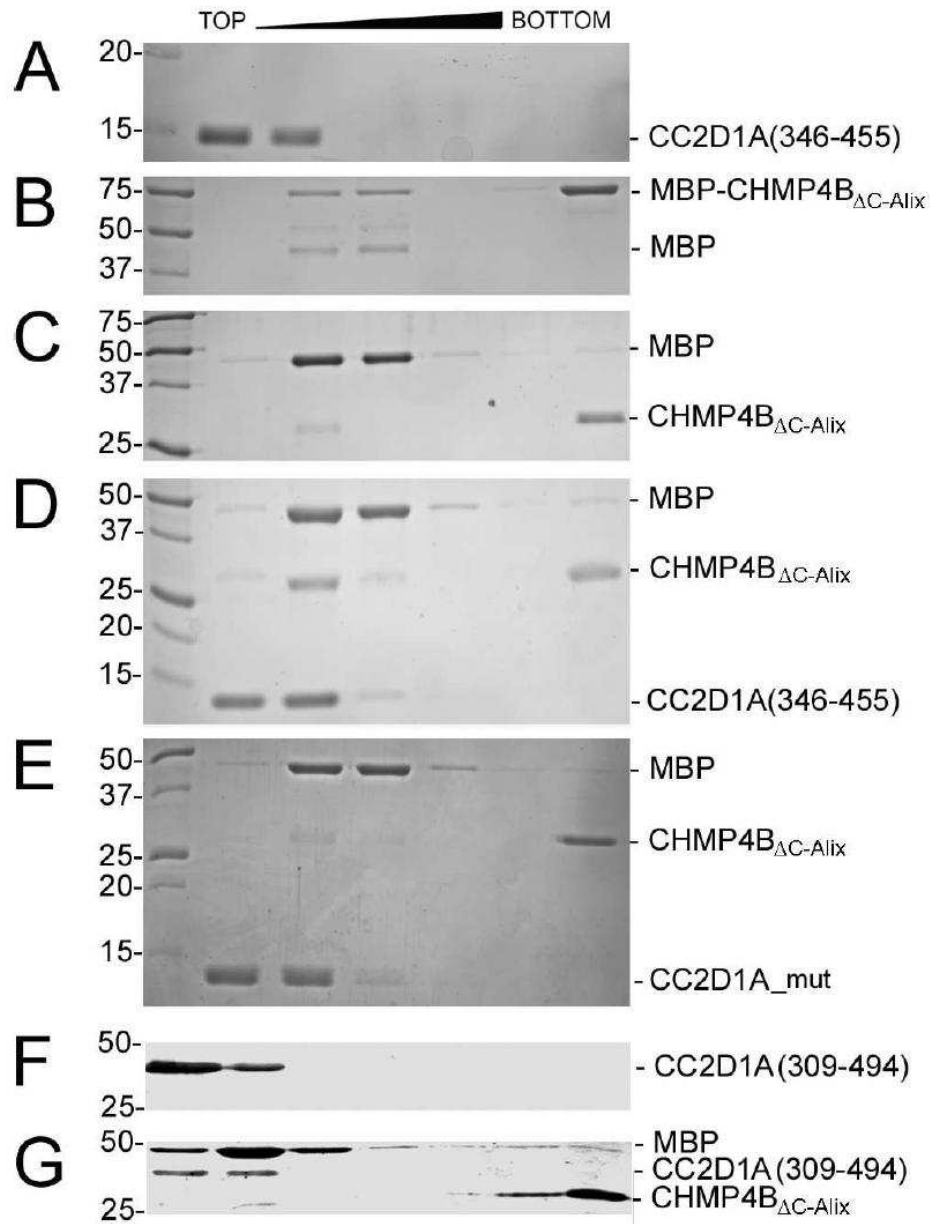


Figure 4. CC2D1A prevents CHMP4B polymerization. Sucrose gradient analyses of MBP-CHMP4B Δ C-Alix, CHMP4B Δ C-Alix and CC2D1A.

(A) CC2D1A(346-455); (B) MBP-CHMP4B Δ C-Alix; (C) MBP-CHMP4B Δ C-Alix after TEV protease cleavage; (D) MBP-CHMP4B Δ C-Alix was incubated with CC2D1A(346-455) and then subjected to TEV protease cleavage; (E) MBP-CHMP4B Δ C-Alix was incubated with CC2D1A_{mut} and then subjected to TEV protease cleavage.

(F) CC2D1A(309-494) and (G) CHMP4B Δ C-Alix polymers were incubated with CC2D1A(309-494).

Figure 5

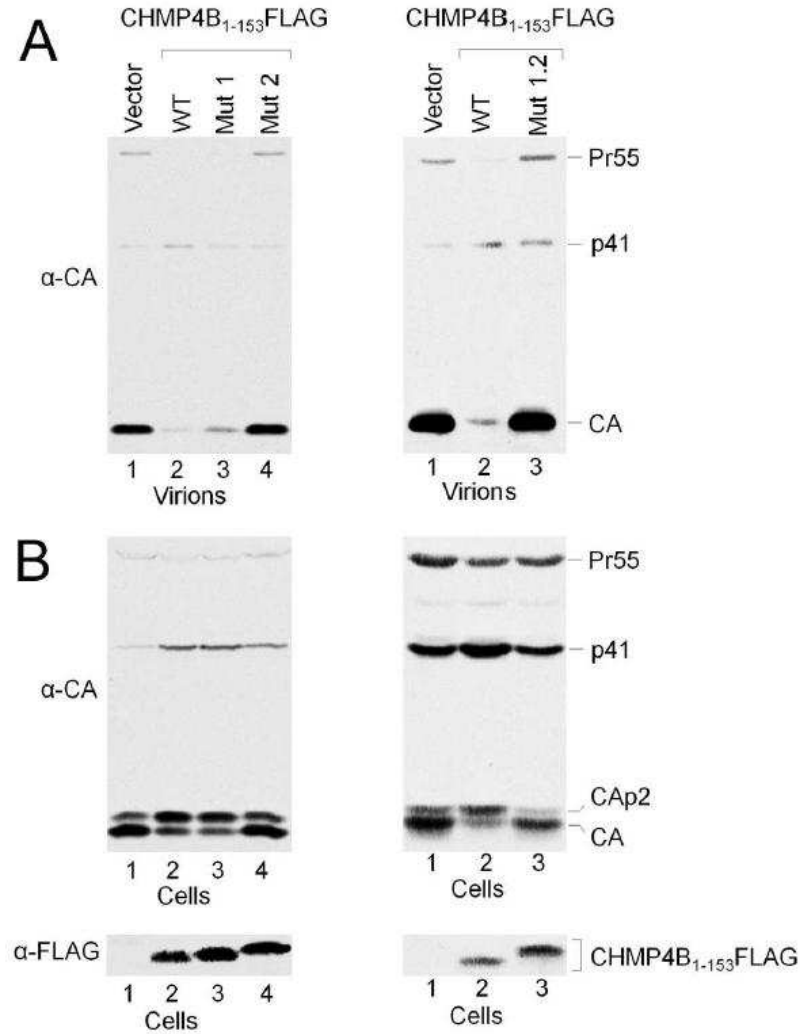


Figure 5. Mutations in CHMP4B annul the dominant negative effect of C-terminally truncated CHMP4B.

(A) (Left panel) Expression of wild type CHMP4B₁₋₁₅₃FLAG exerts a strong dominant negative effect on HIV-1 budding (lane 2) as compared to the vector control (lane 1). Expression of CHMP4B_{1-153mut1} shows that it is still dominant negative (lane 3), while CHMP4B_{1-153mut2} lost the dominant negative effect (lane 4). (Right panel) lane 1 vector only control; lane 2, expression of wild type CHMP4B₁₋₁₅₃FLAG exerts a strong dominant negative effect and lane 3, the double mutant CHMP4B_{1-153mut1.2} is no longer dominant negative.

(B) Western blot revealing the intracellular Gag processing corresponding to the panels shown in (A). (Lower panel), Western blot showing the expression levels of the CHMP4B constructs.

Figure 6

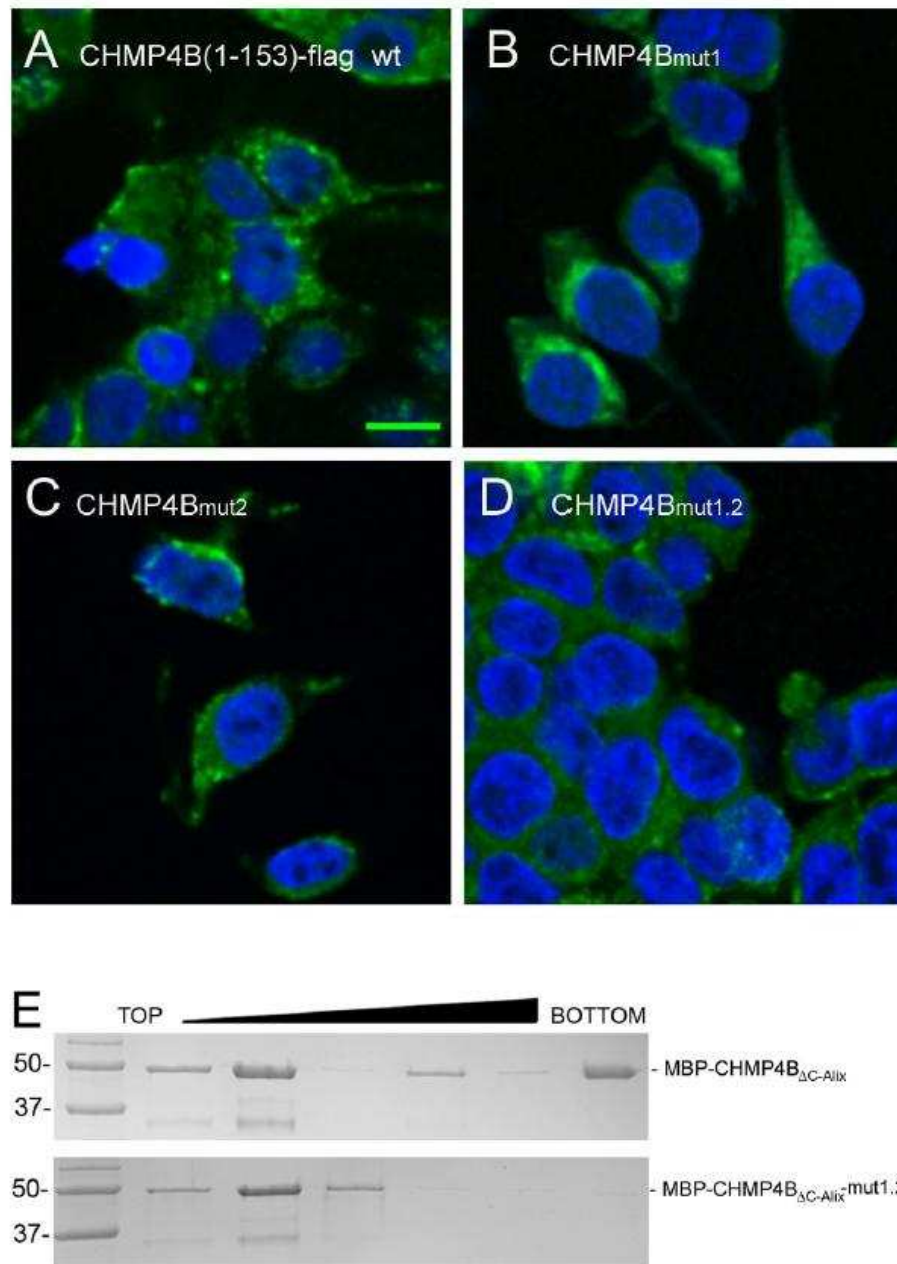


Figure 6. The mut1.2 surface patch is important for plasma membrane localization and polymerization of CHMP4B *in vitro*.

Confocal microscopy of CHMP4B(1-153)-flag localization in HEK293 cells.

(A) CHMP4B(1-153)-flag wild type, (B) CHMP4B(1-153)-flag carrying the mut1, (C) the mut2 and (D) the mut1.2 surface patch mutations. Individual confocal Z-sections are shown. Nuclei have been stained with DAPI. Scale bar 10 μm.

(E) Sucrose gradient analyses of recombinant wild type MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX} (top panel) and MBP-CHMP4B_{ΔC-ALIX} carrying the mut1.2 surface patch mutations (bottom panel). Molecular weight markers are indicated.

Table 1. Isothermal titration calorimetry of the CC2D1 interaction with CHMP4. The standard error associated with the values for N, ΔH and K_D are derived from the *Nonlinear Least Squares Fitting* of the curves shown in Figure S1.

Cell (μM)	Syringe (μM)	N	ΔH (kcal/mol)	K_D (nMol)	
CC2D1B(1-601)	10 MBP-CHMP4B(7-110)	85	1.02 ± 0.007	-13710 ± 123.3	382 ± 24
MBP-CHMP4B(7-110)	10 CC2D1A(309-494)	253	0.84 ± 0.006	-7381 ± 67.58	351 ± 22
MBP-CHMP4B(7-110)	9 CC2D1A(346-494)	145	1.03 ± 0.009	-8164 ± 91.52	719 ± 41
MBP-CHMP4B(7-110)	9 CC2D1A(346-455)	117	0.90 ± 0.007	-8193 ± 84.49	680 ± 34
MBP-CHMP4B(23-97)	14 CC2D1A(346-455)	200	0.90 ± 0.019	-14600 ± 166.9	5495 ± 118

Table 2. Data collection and refinement statistics

CHMP4 (SeMet)	
Data Collection	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions; a, b, c (Å)	37.59, 71.43, 123.68
Wavelength (Å)	0.9795
Resolution	41.23 -1.80 / (1.90- 1.80)
R _{merge}	0.074 (0.414)
I / σI	16.3 (4.4)
Completeness (%)	99.7 (100.0)
Multiplicity	7.0 (7.1)
Anomalous completeness	99.6 (100.0)
Anomalous multiplicity	3.6 (3.6)
Total observations	220642 (32311)
Unique reflections	31659 (4520)
Wilson B-factor (Å ²)	23.3
Refinement	
Resolution (Å)	1.80
R _{work} (N° reflections)	0.227 (30007)
R _{free} (N° reflections)	0.285 (1588)
No. atoms	
Protein	2693
Water	137
B-factors (Å ²)	
Protein	16.78
Water	27.6
R.m.s deviations	
Bond lengths (Å)	0.018
Bond angles (°)	0.884

* Values in parentheses are for highest resolution shell

Table 3. Surface Plasmon resonance measurements of the CHMP4B and CC2D1A interaction. The standard errors (SE) are derived from 4 measurements.

Ligand	Analyte	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (nMol)	Chi ²
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105)	25 ± 2	7.9 ± 0.28	320	0.244
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut1}	1.2 ± 0.13	1.7 ± 0.12	1400	1.16
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut2}	-	-	-	-
CC2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut1,2}	-	-	-	-

Supplemental Figures

CC2D1A is a regulator of ESCRT-III CHMP4B polymer formation

Nicolas Martinelli^{1,4}, Bettina Hartlieb^{1,4}, Yoshiko Usami², Charles Sabin¹, Aurelien Dordor¹, Nolwenn Miguet¹, Sergiy V. Avilov^{1,3}, Euripedes A. Ribeiro Jr¹, Heinrich Göttlinger² and Winfried Weissenhorn^{1,5}

¹Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Program in Gene Function and Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01605, USA

³European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, BP181, 38042 Grenoble Cedex 9, France

⁴These authors contributed equally

⁵Corresponding author: Winfried Weissenhorn, e-mail: weissenhorn@embl.fr

Tel: 33-476-207281 Fax: 33-476-209400

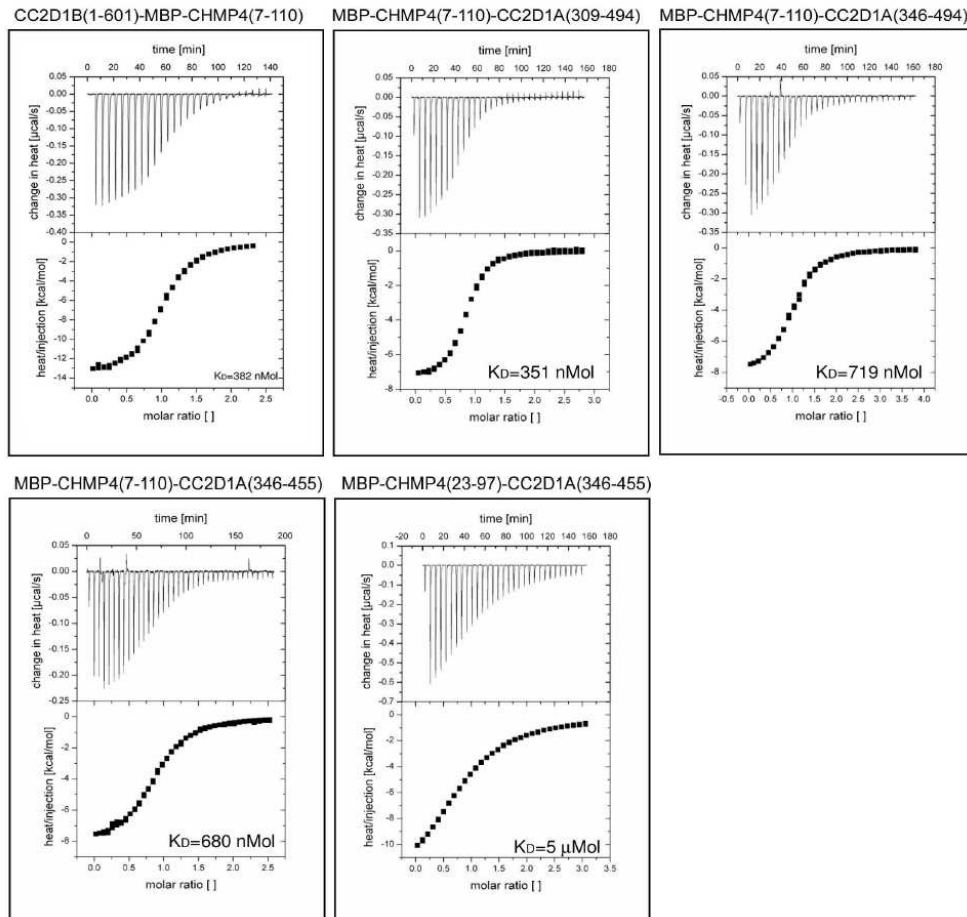


Figure S1. Isothermal titration calorimetry of MBP-CHMP4B(7-110) and MBP-CHMP4B(23-97) and CC2D1B and CC2D1A constructs as indicated. Details of the measurement are listed in table 1.

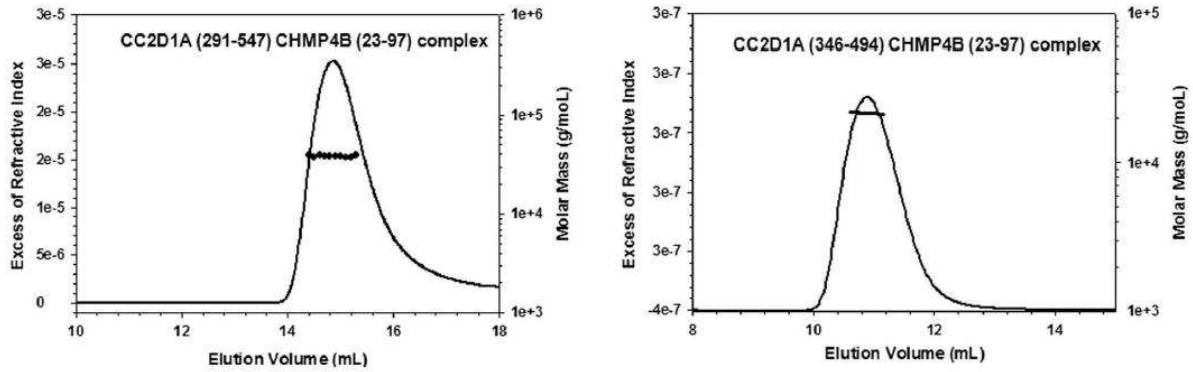


Figure S2. SEC in combination with RI (refractive index) and MALLS (Multi Angle Laser Light Scattering) analyses reveal 1:1 complexes for CC2D1A(291-547)-CHMP4B(23-97) (left panel) and CC2D1A(346-494)-CHMP4B(23-97) (right panel). The molecular weight of a 1:1 complex of CC2D1A(291-547)-CHMP4B(23-97) derived from MALLS is 38 kDa compared to the calculated molecular weight of 41.7 kDa. The MALLS derived molecular weight of a 1:1 complex of CC2D1A(346-494)-CHMP4B(23-97) is 21.5 kDa compared to the calculated molecular weight of 25.5 kDa.

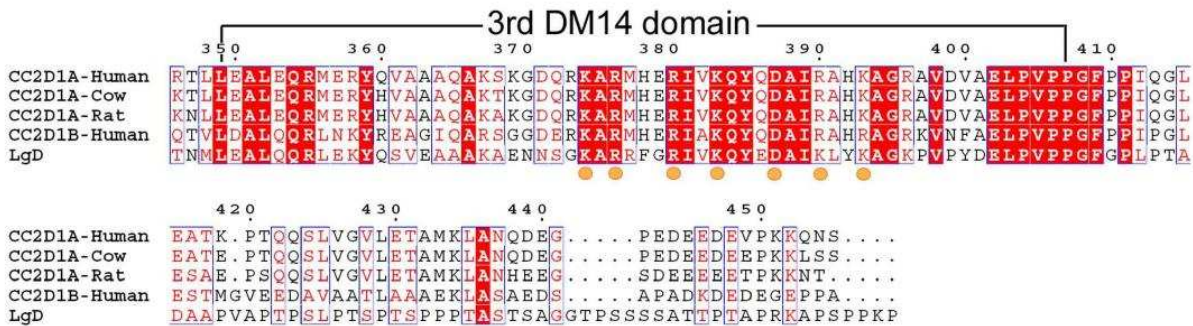


Figure S3. Sequence alignment of residues 346 to 454 of human CC2D1A (NP_060191.3) with human CC2D1B (CAI12284.1), cow CC2D1A (NP_001092424.1), rat CC2D1A (NP_001013891.1) and drosophila Lgd (NP_609488.1). Because all isoforms bind CHMP4B, strictly conserved residues were chosen for mutagenesis as indicated by orange dots; K374, R376, R380, K383, D387, R390 and K394. The prediction of the 3rd DM14 domain is outlined.

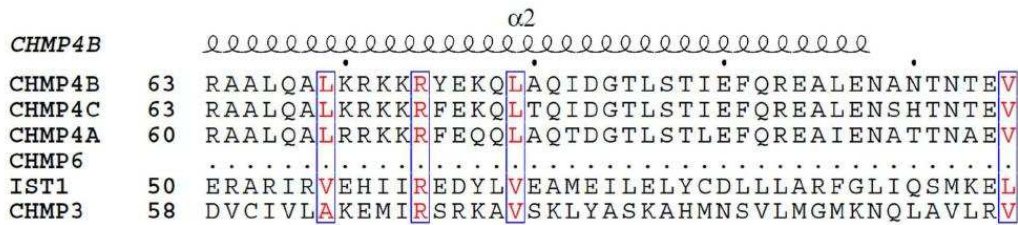
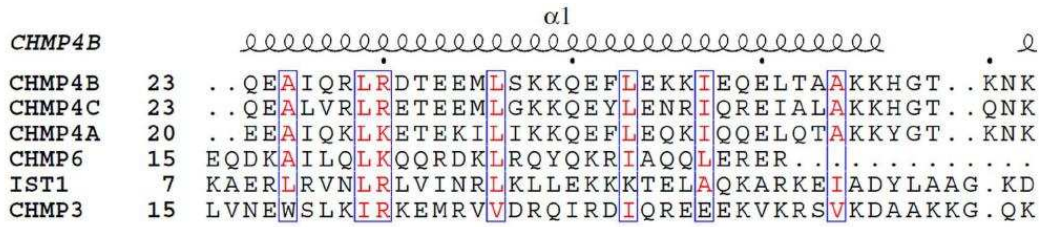


Figure S4. Structure based sequence alignment of CHMP4A, B, C, CHMP6, CHMP3 and IST1 regions comprising α helices 1 and 2.

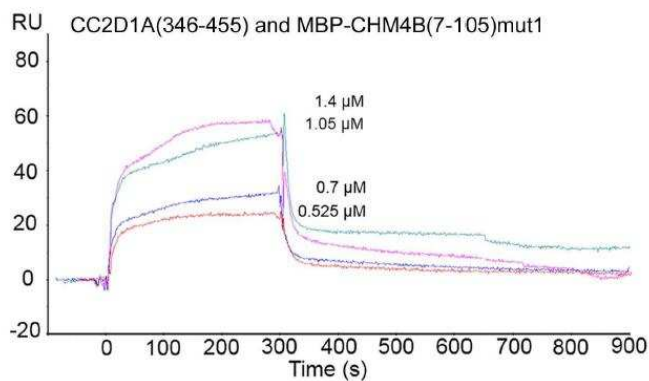
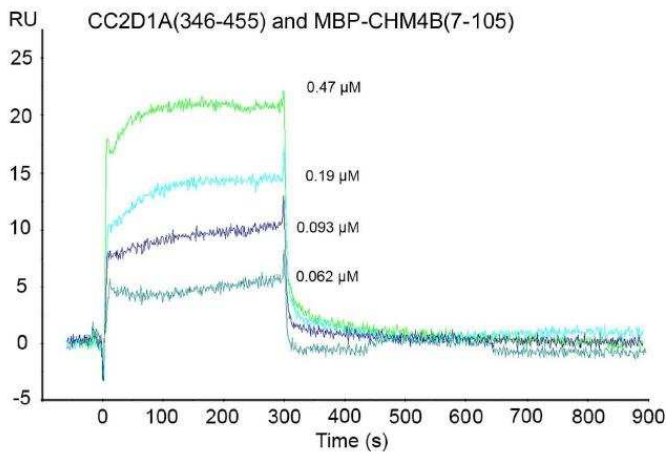


Figure S5. SPR analyses of CC2D1A(346-455) binding to MBP-CHMP4B(7-105) wild type (upper panel) and MBP-CHMP4B(7-105)_{mut1} (lower panel).

```

CC2D1A-Human-DM14-I   ...TTCERLALYQTATESARQAGFSAKMRYDRGETLENLLEASIRKGNATDEADTPP.PVA...I
CC2D1A-Human-DM14-II  ...LAQLQSRQRDYKLAALHAKQGGTTAAARHFRRVAKSFDAVLEALSRRGEPVDLSCLPPPDPQ...L
CC2D1A-Human-DM14-III RTLLBALEQRMERYQVAAQAQAKSKGQRRKARMHERIVRQYQDAIRAHKACRAVDVAVELPVPFGFP...PI
CC2D1A-Human-DM14-IV  ...LAFLEGRKKQLLQAALRAKQKNQVEGAKMHLRQAKGLEPMLEASRNCLPVDITRVPAPVVKDDFAL

```



```

CC2D1A-Human-DM14-I   GKGPASTPTYSFAPTQPAPRIA SAPEPRVT.....
CC2D1A-Human-DM14-II  PPDPPSPPTQPPTPATAPSTTEVPPPP.....
CC2D1A-Human-DM14-III QGLEATKPTQQSLVGVLETAMKLANQDEGPEDEEVEVPKKQNS
CC2D1A-Human-DM14-IV  VQRPGPGLSQEAARRYGELTKLIRQQHEMCLNHSNQFTQLGNI

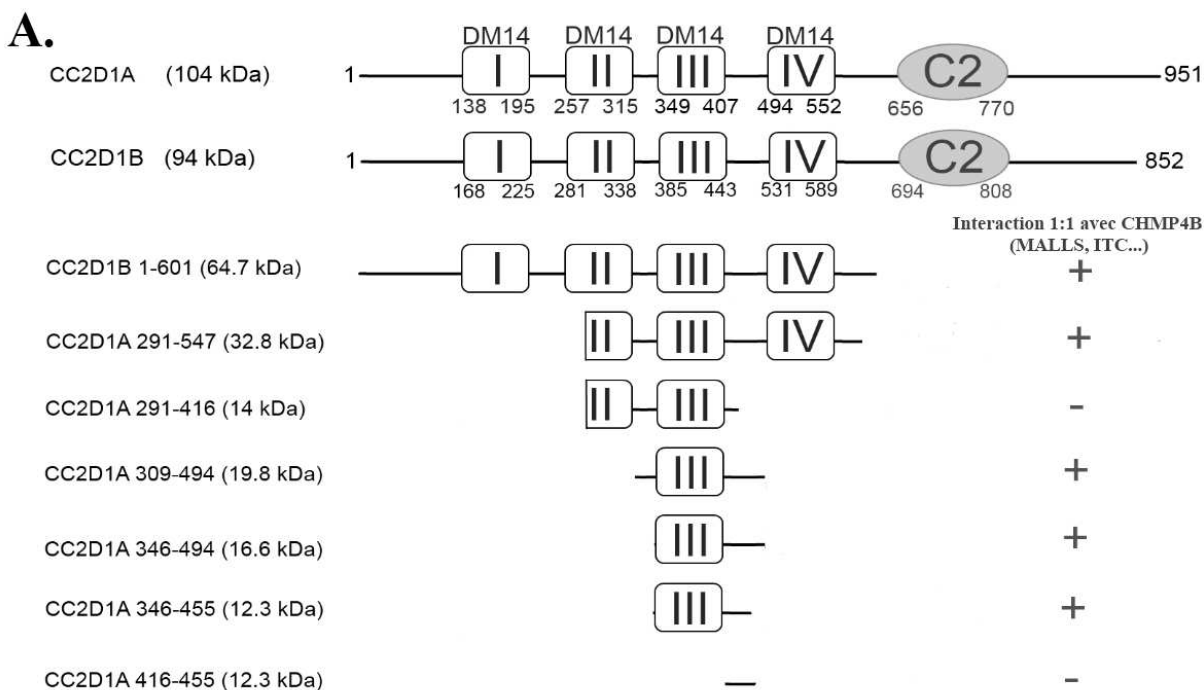
```

Figure S6. Sequence alignment of all four human CC2D1A DM14 domains. The amino acids changed within the third DM14 domain that affect CHMP4 binding are labeled by orange dots.

CHAPITRE III – CC2D1A est un nouveau régulateur de polymérisation de CHMP4B.

1. Introduction

Avant mon arrivée, le docteur Bettina Hartlieb (postdoctorante au laboratoire), avait pu identifier le fragment CHMP4B 23-97 comme fragment minimal capable d'interagir avec CC2D1A, selon une stoechiométrie de 1 :1 (voir figure 29). L'objectif principal de ce travail concernait la cristallisation d'une



B.

Cellule (μM)	Seringue (μM)	N	ΔH (kcal/mol)	K_D (nMol)	
CC2D1B(1-601)	10 MBP-CHMP4B(7-110)	85	1.02 ± 0.007	-13710 ± 123.3	382 ± 24
MBP-CHMP4B(7-110)	10 CC2D1A(309-494)	253	0.84 ± 0.006	-7381 ± 67.58	351 ± 22
MBP-CHMP4B(7-110)	9 CC2D1A(346-494)	145	1.03 ± 0.009	-8164 ± 91.52	719 ± 41
MBP-CHMP4B(7-110)	9 CC2D1A(346-455)	117	0.90 ± 0.007	-8193 ± 84.49	680 ± 34
MBP-CHMP4B(23-97)	14 CC2D1A(346-455)	200	0.90 ± 0.019	-14600 ± 166.9	5495 ± 118

Figure 29 : récapitulatif des données ITC entre CC2D1A/B et CHMP4B 7-110 mesurées par le Dr Hartlieb. La délétion des extrémités N- et C-terminales de CHMP4B perturbe la formation du complexe.

A. Schéma des différentes constructions réalisées pour l'étude.

B. La troisième répétition DM14 est spécifiquement impliquée dans l'interaction avec CHMP4B. La délétion simultanée des extrémités N- et C-terminales de CHMP4B diminue cette interaction d'un facteur 10, ce qui suggère un rôle des régions 7-23 et 97-110 dans l'interaction.

partie de CC2D1A/B avec ce fragment minimal, afin d'en résoudre la structure. Le Dr. Hartlieb a pu notamment identifier la région comprenant la troisième répétition DM14 comme cruciale dans l'interaction.

L'interaction entre CC2D1A ou CC2D1B et CHMP4B a été mise en évidence et quantifiée in vitro par plusieurs méthodes (ITC, SPR, MALLS, Pulldowns). Le fragment CHMP4B 7-110 interagit avec une affinité **de l'ordre du microMolaire** (entre 0.3 et 0.7 μM selon les constructions et les méthodes). Cette affinité, comparable à celle mesurée pour certaines interactions entre protéines CHMP (voir précédent chapitre), suggère que CC2D1A interagit avec CHMP4B en formant un complexe relativement stable. On note toutefois, en présence d'un tampon riche en sel (1M NaCl), une dissociation importante du complexe ce qui suggère également que l'interaction rapportée entre CC2D1A et CHMP4B est principalement électrostatique.

Cependant, ces constructions tronquées de CC2D1A avec CHMP4B **n'ont pas permis d'obtenir la structure du complexe**, et ce malgré de nombreuses tentatives de cristallisation. Pour une de ces tentatives, en revanche, le Dr Hartlieb a pu obtenir des cristaux à 1.9 Å du fragment CHMP4B 23-97 isolé, ce dernier cristallisant seul dans la goutte.

2. Analyse de la structure cristallographique de CHMP4B 23-97

2.1 Les extrémités N- et C-terminales du fragment définissent une interface de dimérisation

La construction CHMP4B 23-97 comprend les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, formées respectivement par les séquences 23-57 et 61-97, soit la partie n-terminale de la protéine complète. En superposant les $C\alpha$ de CHMP4 avec les structures déjà connues de CHMP3 et IST1 (rmsd respectifs de 2.687 et 3.323 Å), on observe une forte homologie avec ces protéines malgré une séquence peu conservée. En outre, la représentation en surface de la structure montre une répartition des charges inégale (**voir figure 31**), avec une surface chargée négativement à l'extrémité de l'épingle, et la surface opposée (autour de la boucle) chargée positivement. CHMP4B étant capable de polymériser in vivo et in vitro, il est donc possible que ces interfaces soient impliquées dans des interactions CHMP4B-CHMP4B.

Dans l'unité asymétrique (voir figure 30), les quatre molécules définissent plusieurs interfaces cristallographiques. Bien que CHMP4B 23-97 en solution soit un monomère, CHMP4B polymérise in vitro et in vivo. Les représentations de ces polymères se bornent à des données de microscopie électronique à basse résolution, et ne permettent pas de mettre en évidence précisément les résidus impliqués. J'identifie cependant, à partir du serveur PISA, une interface stable susceptible de correspondre à une authentique interface biologique. Le serveur détermine une « P-value » de 0.065, soit une valeur bien inférieure (<0.5) à celle attendue pour une interface aléatoire et/ou artefactuelle. Cette interface de 1740 Å² (délimitée dans la figure 30 par les monomères rouge et vert), présente un ΔG^{int} de -15.7 kcal/mol et un ΔG^{diss} de 7.5 kcal/mol. Cette dernière valeur correspondant à la différence théorique d'énergie libre entre l'état de dissociation et l'état d'association, une valeur positive correspond donc à la **formation d'un complexe stable théorique**. Cette interface comprend les résidus **25 à 42** ($\alpha 1$) et les résidus **78 à 96** ($\alpha 2$), soit les extrémités des deux hélices α . En particulier, les résidus **R28, T32, T85 et Q92** sont impliqués dans six liaisons hydrogènes et sont conservés pour les trois isoformes CHMP4 (**voir**

figure 32). Il semble donc que l' arrangement antiparallèle des deux molécules reflète un rôle particulier des extrémités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dans la formation ou la stabilisation du polymère.

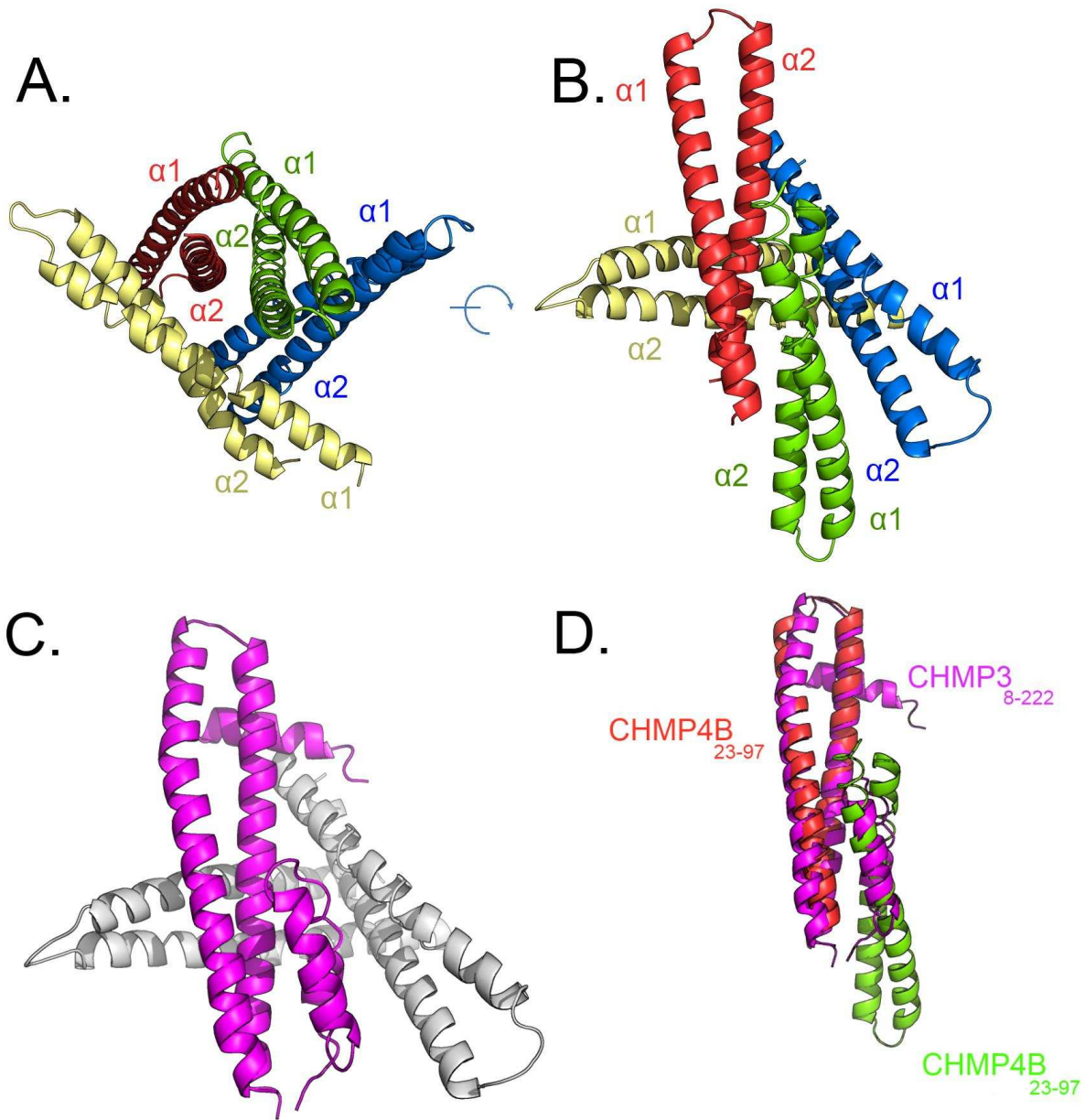


Figure 30 : la structure du fragment 23-97 de CHMP4B met en évidence 4 molécules par unité asymétrique.

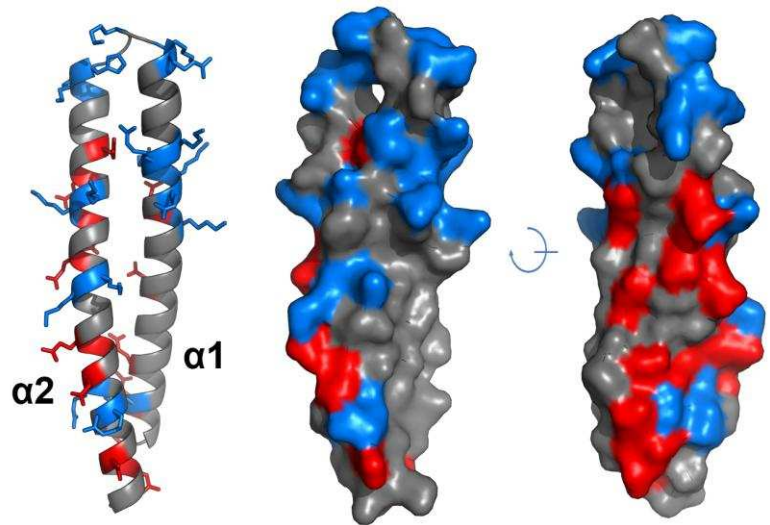
A-B : L'empilement cristallin met en évidence plusieurs interfaces cristallographiques : seule l'interface entre la molécule A (en rouge) et la molécule B (en vert) est considérée significative par le serveur PISA.

C : La superposition de CHMP4B avec CHMP3 (PDB : 3FRT) permet de prédire la position des hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ absentes dans la construction

D. Dans le cristal la seconde molécule CHMP4B formant le dimère se situe dans le prolongement théorique des hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ manquantes.

Figure 31: Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de CHMP4B forment une surface fortement amphipatique, avec une répartition inégale des charges positives et négatives.

Les résidus Lysine, Arginine et Histidine sont chargés positivement et sont marqués en marine. Les acides glutamiques et aspartiques sont chargés négativement et sont colorés en rouge.



Le fragment cristallisé est extrêmement proche de l'épingle retrouvée dans la structure cristallographique de CHMP3 (rmsd de 2.687Å). En revanche, contrairement à CHMP3, cette structure ne possède que les deux premières hélices α . J'ai donc essayé d'extrapoler la position des hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5$ manquantes sur la base de la structure CHMP3 obtenue par Bajorek (Bajorek et al., 2009). Dans ce modèle, les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$ viennent se placer respectivement dans l'axe des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 1$ de la molécule CHMP4B adjacente composant le dimère cristallographique : cette donnée implique donc que le dimère proposé par PISA n'est pas compatible avec le repliement connu de CHMP3. Si on accorde donc du crédit à l'assemblage proposé par PISA, cette interface ne serait accessible qu'après dissociation d' $\alpha 3$ et $\alpha 4$.

2.2 la forme cristallisée présente une hélice $\alpha 2$ incomplète.

L'alignement avec CHMP3 montre dans la structure CHMP4B une hélice $\alpha 2$ incomplète, cette dernière étant vraisemblablement tronquée de 8 acides aminés par rapport à l'alignement précis des deux protéines, soit environ deux tours d'hélices. La séquence terminale présente dans la structure présente le motif **REALE** ; or, si l'on se réfère au modèle de CHMP3 disponible, l'hélice $\alpha 2$ dans sa totalité devrait théoriquement comprendre à son extrémité le motif **REALENANTNTEV**. L'interface formée dans le crystal est donc probablement incomplète, **et potentiellement déstabilisée**.

L'interaction entre CHMP4B 23-97 et CC2D1A 346-455 est faible, avec un Kd de l'ordre de 5.5 μ M. Cette valeur est donc près de 10 fois supérieure à celle observée pour la construction « élargie » CHMP4B 7-110.

Rétrospectivement, on peut donc tirer deux conclusions de cette différence.

La première est purement « technique », en ce sens que la faible affinité de CHMP4B 23-97 ait pu conduire à la formation d'un complexe instable, propice à une dissociation dans la goutte de cristallisation, et/ou après filtration sur gel du complexe. **La seconde** est en revanche fonctionnelle, puisqu'elle indique que la troncature des extrémités N- et C-terminales de l'épingle **déstabilise** l'interaction ; CC2D1A interagissant spécifiquement avec les isoformes CHMP4, cette donnée nous a donc incité à muter des résidus CHMP4B au niveau de ces deux extrémités, en ciblant en particulier des résidus à la fois conservés pour tous les isoformes, et absents chez les autres protéines ESCRT-III.

3. Mise en évidence de mutants CHMP4B

Sur la base des alignements de séquence des trois isoformes CHMP4A, CHMP4B et CHMP4C, le Dr Hartlieb avait identifié **deux jeux de mutations** susceptibles d'être impliqués dans l'interaction CHMP4B-CC2D1A.

Le quadruple mutant, appelé « Mut1 », correspond à la construction **CHMP4B_{R28AR30AD31RE33R}** et comprend donc quatre mutations à la base de l'hélice $\alpha 1$. Le second, appelé « Mut1.2 », présente outre les quatre premières mutations trois nouvelles mutations **E90RE94RE97 à la base de l'hélice $\alpha 2$** . Ensemble, ces deux jeux de résidus définissent donc deux régions fortement chargées à la base de la boucle, orientées sur la face **opposée** de celle impliquée dans l'interaction $\alpha 1$ - $\alpha 4$ et $\alpha 2$ - $\alpha 3$. Puisque CC2D1A interagit en pulldowns avec une construction MBP-CHMP4B Δ C_{Alix} comprenant les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$, une hypothèse était donc que ces résidus soient également accessibles en solution pour l'interaction CC2D1A-CHMP4B.

A partir d'un clone MBPCHMP4B₂₃₋₉₇, le Dr Hartlieb avait en particulier détecté une **perte d'interaction** par pulldowns chez le mutant 1.2, tandis que le mutant simple mut1 interagissait toujours. Cette donnée suggérait donc que les trois résidus E90, E94, et E97, et donc l'hélice $\alpha 2$, sont directement impliqués dans l'interaction. Outre l'absence d'un mutant « Mut2 » simple, une autre réserve liée à cette expérience de pulldown concernait le choix du fragment tronqué 23-97, connu pour former un complexe moins stable par ITC que le fragment élargi CHMP4B 7-110. Afin de lever l'ambiguïté relative au rôle précis des résidus composant le patch Mut2, j'ai donc entrepris de recloner le fragment sur une construction étendue CHMP4B 7-105, en accord avec les données tirées de la structure cristallographique.

Par pulldowns (**voir figure 33**), il apparaît bien que les constructions sauvage et CHMP4B 7-105_{Mut1} sont toujours capable de fixer le peptide CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅. En revanche, les constructions CHMP4B 7-105_{Mut2} et CHMP4B 7-105_{Mut1+2} ne sont plus capables d'interagir : ce résultat important indique donc que c'est principalement **la base de l'hélice $\alpha 2$** qui est impliquée dans l'interaction. Afin de confirmer la perte totale d'interaction de Mut2, j'ai testé l'affinité de ces mutants par SPR (**figure 34**). La protéine sauvage MBP-CHMP4B 7-105 sert ici de contrôle : on retrouve donc avec cette nouvelle technique une affinité d'environ 0.3 μ M, du même ordre de grandeur que la valeur obtenue par ITC pour le fragment CHMP4B 7-110. En revanche, aucun signal n'est retrouvé pour les constructions Mut2 et Mut1.2, ce qui confirme ici l'abolition **complète** de l'interaction.

On retrouve toutefois un signal pour la construction Mut1, en accord avec les précédentes données obtenues par pulldown : l'interaction chez ce mutant est légèrement réduite, de l'ordre de 1.4 μ M, ce qui

suggère un rôle moindre de l'hélice $\alpha 1$ dans cette interaction. En l'état, la mise en évidence de l'extrémité c-terminale de $\alpha 2$ comme site d'interaction principal suggère également que la déstabilisation de cette hélice dans la construction CHMP4B 23-97 soit une des causes de la déstabilisation du complexe.

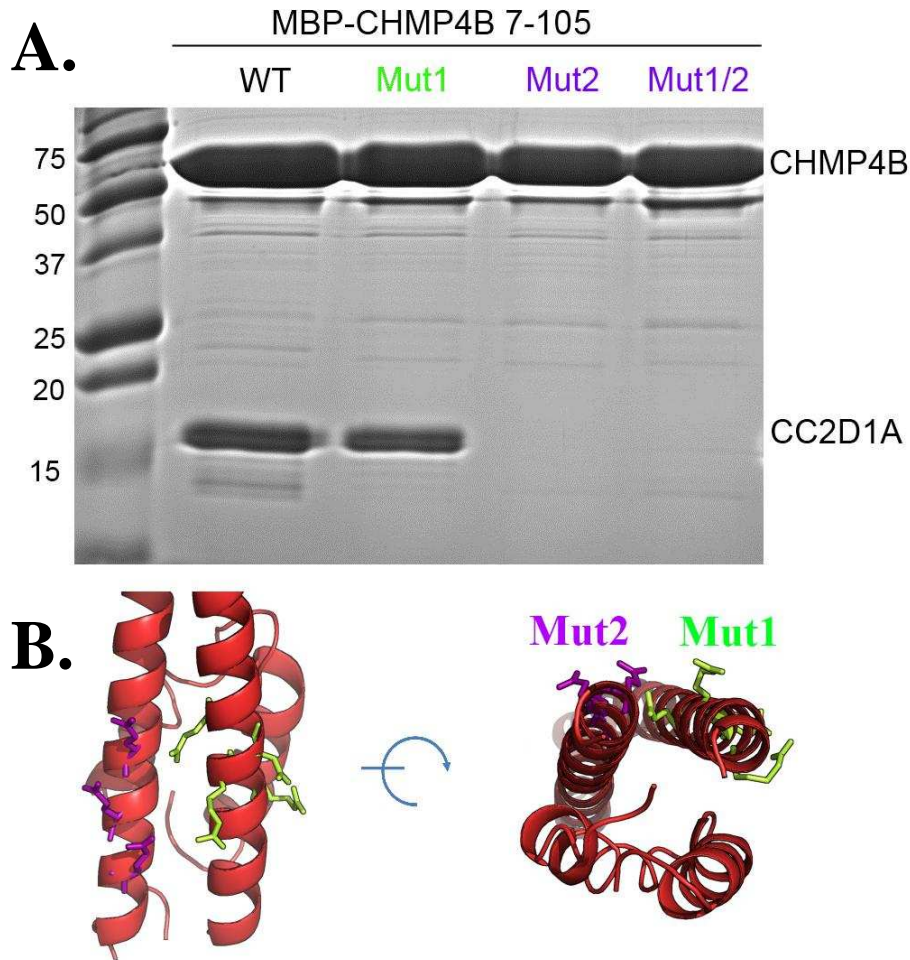
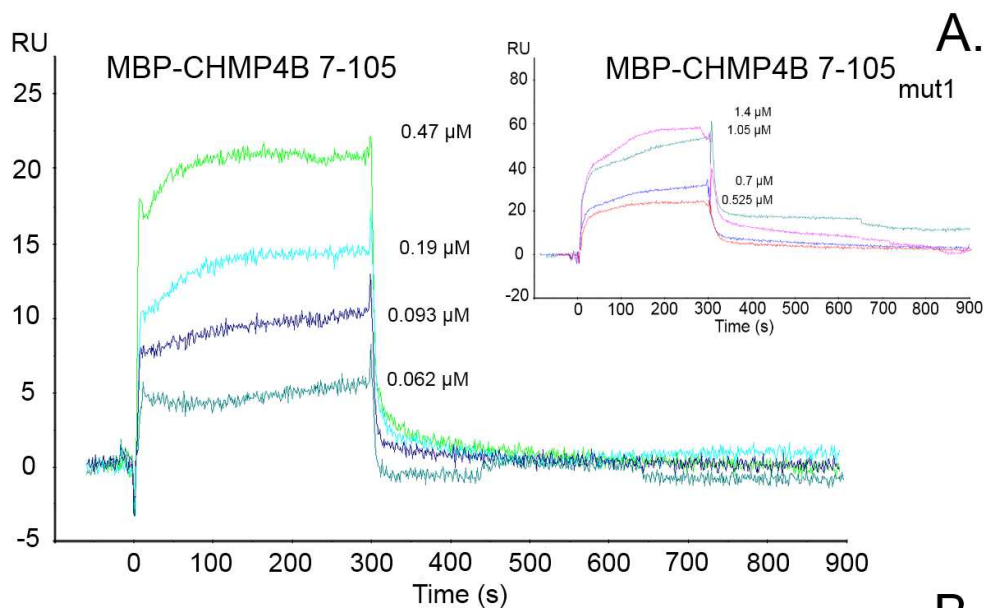


Figure 33 : l'interaction entre CHMP4B et CC2D1A 346-455 est principalement médiée par l'extrémité c-terminale de l'hélice $\alpha 2$.

- A.** Le triple mutant CHMP4B_{E90RE94RE97R} (« Mut2 ») n'interagit plus avec CC2D1A 346-455, contrairement au mutant CHMP4B_{R28AR340AD31RE33R} (« Mut1 »).
- B.** Positionnement des deux jeux de mutation, **Mut1** et **Mut2** dans le contexte du monomère CHMP4B complet.



Ligand	Analyte	k_a ($10^3 M^{-1} s^{-1}$)	k_d ($10^{-3} s^{-1}$)	K_D (nMol)	χ^2
C2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105)	25 ± 2	7.9 ± 0.28	320	0.244
C2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut1}	1.2 ± 0.13	1.7 ± 0.12	1400	1.16
C2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut2}	-	-	-	-
C2D1A(346-455)	MBP-CHMP4B(7-105) _{mut1.2}	-	-	-	-

Figure 34 : aucune interaction avec CC2D1A n'est mesurée pour le mutant « Mut2 » et le double mutant CHMP4B par résonance plasmique de surface (« Surface Plasma Resonance » ou SPR).

- A. Profils SPR des protéine CHMP4B sauvage et mut1 sur une puce CM5 couplée à CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅.
- B. Récapitulatif des interactions identifiées par SPR. Tous les mutants sont testés avec quatre concentrations différentes, de 0.5 à 1.4 μM . Les mutants « mut1 » et « mut1.2 » ne donnent aucun signal enregistrable, montrant ainsi la perte totale d'interaction.

4. Mise en évidence d'un mutant CC2D1A ne liant plus CHMP4B

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés au site d'interaction de CC2D1A, ainsi qu'à la mise en évidence d'un mutant CC2D1A incapable de lier CHMP4B. En comparant les séquences de CC2D1A et de CC2D1B pour plusieurs espèces, on distingue au sein de la troisième répétition trois régions fortement conservées. J'ai donc muté la seconde région au niveau de sept résidus (**K374A, R376A, R380A, K383A, D387A, R390A, K393A**). Ces résidus sont strictement conservés entre espèces et isoformes et spécifiques de la troisième répétition DM14, en accord avec les données expérimentales. Le fragment CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ présente en CD un fort signal correspondant à la présence d'hélices α , en accord avec les prédictions bioinformatiques, et un T_m mesuré à environ 67°C. Le mutant est soluble et n'est pas altéré

significativement dans sa structure secondaire ou sa stabilité, comme l'indiquent les données de dichroïsme circulaire (voir figure 36). Comme prédit, ce mutant n'interagit plus avec une résine préincubée avec la construction MBP-CHMP4B₇₋₁₀₅, contrairement au peptide natif CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅. La région linéaire 374-393 est donc importante pour cette interaction. (voir figure 35)

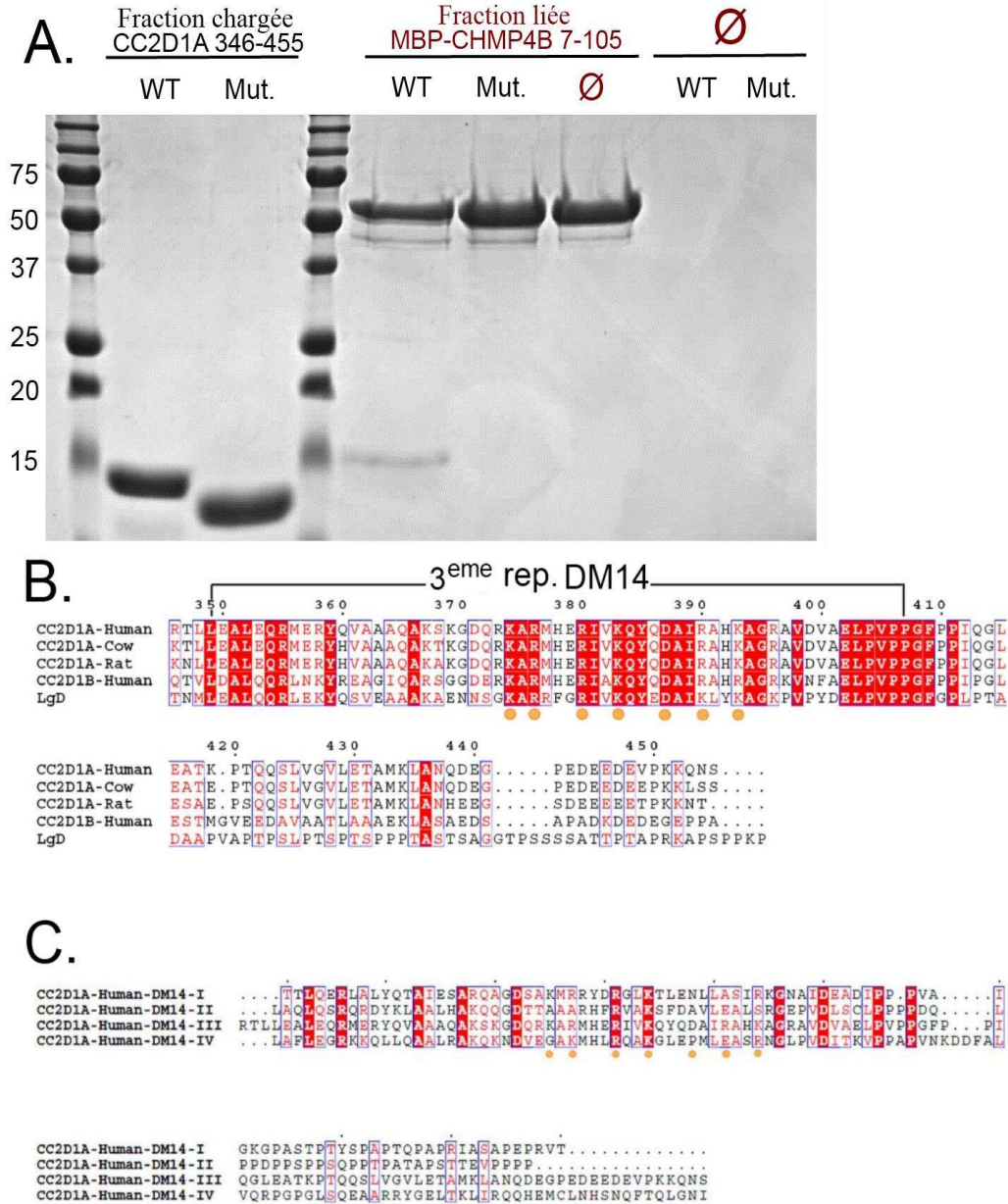


Figure 35 : une série de mutations dans la troisième répétition DM14 abolit l'interaction avec CHMP4B.

- Le peptide CC2D1A_{mut} n'interagit plus avec avec la construction MBP-CHMP4B₇₋₁₀₅.
- L'alignement de cette répétition avec les homologues de vache, de rat ainsi que le second isoforme CC2D1B chez l'homme montre trois régions strictement conservées. Les sept résidus mutés sont marqués en orange (K374A, R376A, R380A, K383A, D387A, R390A, K393A).
- Alignement des quatre motifs DM14 présent dans l'homologue CC2D1A chez l'humain.

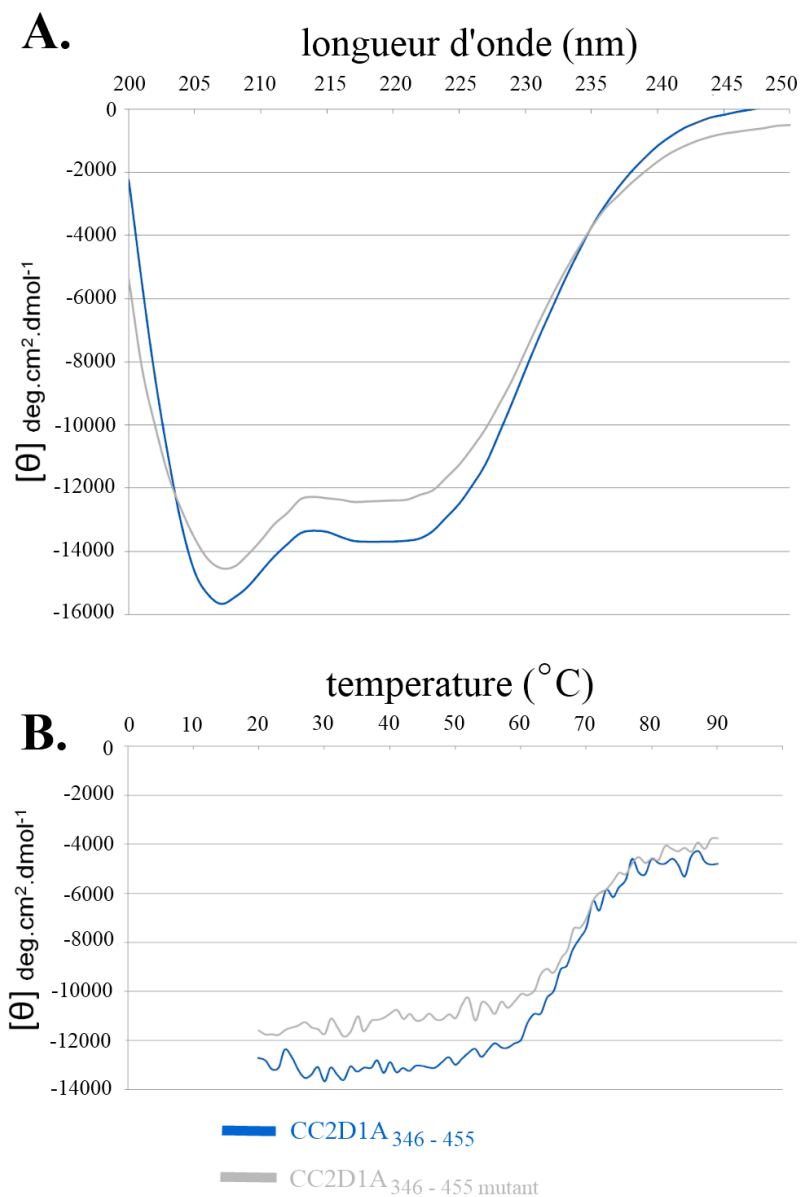


Figure 36 : les peptides CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ sauvage et mutant présentent une thermostabilité comparable.

- A.** Les peptides sauvages et mutant possèdent un spectre en dichroïsme circulaire caractéristique de la présence d'hélices α .
- B.** Spectres CD du peptide sauvage et mutant, et courbes de dénaturation respectives. La stabilité thermique du mutant n'est pas modifiée significativement, comme le montre la stabilité du T_m, de l'ordre de 67°C pour les deux constructions.

5. Implication de CC2D1A dans la polymérisation de CHMP4B

L'interface cristallographique identifiée entre deux monomères CHMP4B suggère que la base de l'épingle formée par $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est impliquée dans la polymérisation de CHMP4B. En outre, nous montrons que cette même région est impliquée dans l'interaction avec CC2D1A, l'hélice $\alpha 2$ semblant être le site d'interaction préférentiel. Si les deux sites sont spatialement proches, on peut donc émettre l'hypothèse que CC2D1A ait une préférence pour la forme monomérique de CHMP4B, le site d'interaction étant potentiellement moins accessible dans le polymère. Des tests préliminaires avaient en effet montré que lorsque CC2D1A est incubé avec des filaments CHMP4B préformés, ces derniers sédimentent au fond du gradient sans interagir avec le peptide. Une conséquence serait donc qu'en incubant CHMP4B sous sa forme monomérique avec un excès du peptide CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅, ce dernier inhiberait la polymérisation de CHMP4B. **Afin de tester cette hypothèse** j'ai utilisé la construction MBP-CHMP4B Δ C-Alix caractérisée par R.Pires (Pires et al., 2009 ; voir également le chapitre V du présent manuscrit).

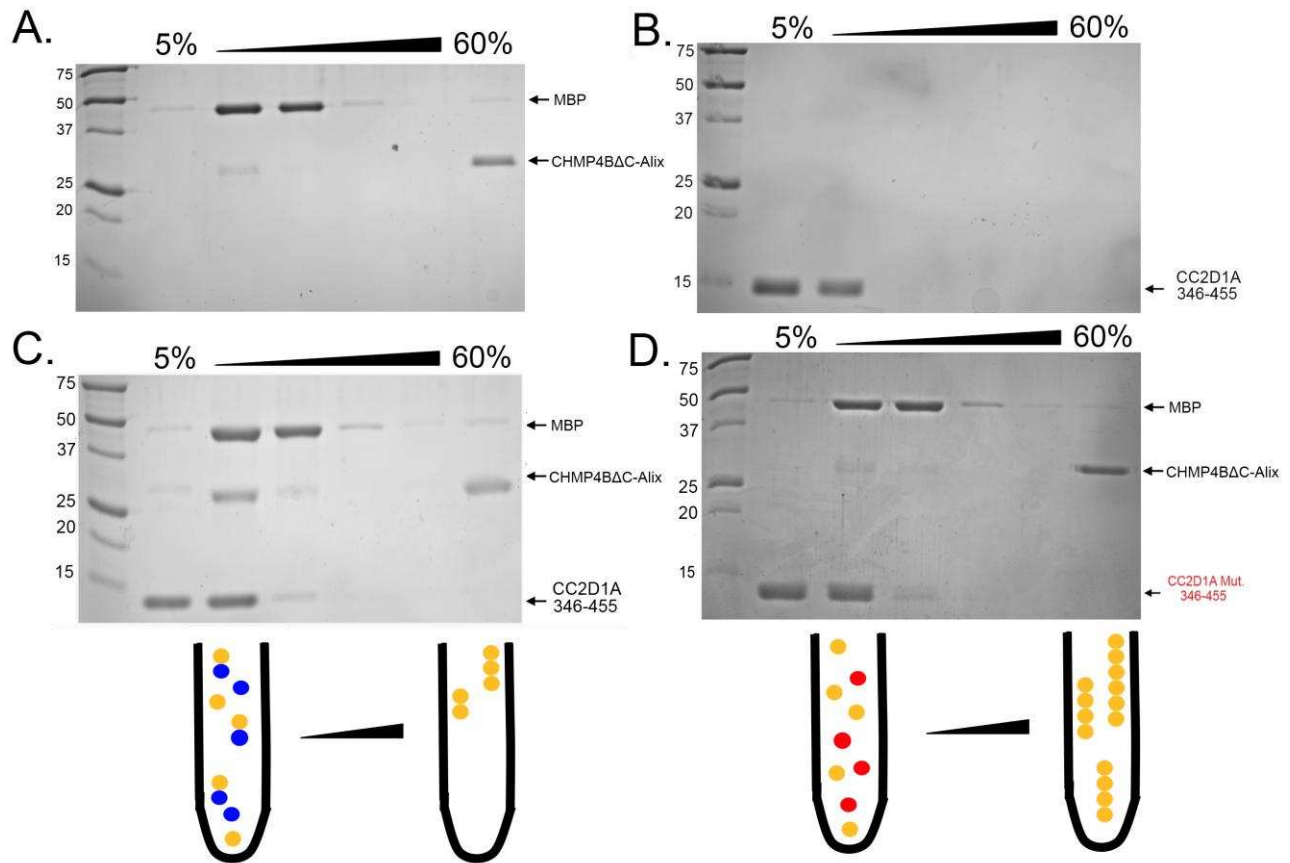


Figure 37: CC2D1A inhibe la polymérisation de CHMP4B.

A-B. CHMP4B polymérise et migre au fond du gradient, tandis que CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ reste au sommet.

C. L'incubation de CC2D1A avec CHMP4B avant clivage prévient la polymérisation de cette dernière.

D. L'incubation d'un mutant CC2D1A ne liant pas CHMP4B abolit l'effet observé pour le peptide CC2D1A sauvage.

Cette construction présente la particularité de pouvoir être purifiée sous forme monomérique en filtration sur gel, dans des proportions qui permettent son étude biochimique. Lorsque cette protéine est concentrée, elle polymérise sous forme de filaments. Le clivage de la MBP avant concentration promeut cette polymérisation, et aboutit à des filaments plus fins et incurvés : cette propriété permet donc d'étudier le processus de polymérisation de façon plus contrôlée, et de quantifier la polymérisation en faisant varier certains paramètres. Ici, j'ai incubé la protéine MBP-CHMP4B Δ C_{.Alix} avec un large excès (5 fois) du peptide CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅, dont nous avons caractérisé l'interaction. L'échantillon est ensuite concentré 10 fois, à une concentration finale de CHMP4B de 15 μ M, puis clivé par TEV pour enlever la MBP et ainsi favoriser la polymérisation.

Les fractions sont chargées au sommet d'un gradient de sucrose, puis sédimentées. Chaque fraction est ensuite prélevée puis chargée sur gel. On observe ici le peptide exclusivement dans la fraction haute du gradient, ce qui confirme le résultat selon lequel le peptide n'interagit qu'avec la forme monomérique de CHMP4. On observe toutefois le maintien d'un pool monomérique de CHMP4B, qui persiste après concentration en comparaison avec le contrôle (**voir figure 37-A et 37-C**). Nous montrons donc ici que CC2D1A rentre également en **compétition** avec une interface requise pour la polymérisation. En réalisant la même expérience avec le mutant CC2D1A qui n'interagit pas avec CHMP4B, le maintien de la forme monomérique est semblable au contrôle.

Cette expérience montre donc que c'est **bien la capacité de CC2D1A à interagir avec CHMP4B** qui est responsable du phénomène d'inhibition.

6. Lien avec le bourgeonnement du VIH

Ayant mis en évidence une interface potentiellement impliquée dans la polymérisation, nous avons donc cherché à savoir si les mutations CHMP4B testées pouvaient avoir un impact sur le bourgeonnement du VIH. Il est en effet connu que des troncations c-terminales de plusieurs protéines CHMPs induisent un effet de dominance-négative dans ce processus (Zamborlini et al., 2006 ; Solomons et al., 2011). Une collaboration avec le laboratoire de Heinrich Gottlinger (UMass) montre d'une part qu'une troncation CHMP4B₁₋₁₅₃FLAG présente le phénomène de dominance-négative attendu (Zamborlini et al., 2006), avec une diminution de la libération de virions dans le milieu de culture, ainsi qu'un défaut dans la maturation de gag dans les cellules infectées. Le mutant 1, qui lie encore CC2D1A sur la base des données de pulldown et de SPR, présente le même profil que la version sauvage tronquée. En revanche le mutant 2, qui ne forme plus de complexe avec CC2D1A, perd également sa capacité à inhiber le bourgeonnement du HIV. Cette donnée montre donc que **le site d'interaction de CC2D1A est important pour la fonction de CHMP4B**.

Puisque ce site d'interaction a un impact sur le bourgeonnement du VIH, nous nous sommes également demandés si CC2D1A elle-même pouvait jouer un rôle dans ce processus. En revanche, ce lien n'a pu être établi à partir des mêmes techniques (H. Gottlinger, W. Weissenhorn, communication personnelle). Il semble donc que, bien que l'intégrité du site soit requise pour le recrutement de CC2D1A et d'ESCRT-III par les virions, CC2D1A lui-même ne joue en revanche pas de rôle **direct** dans le bourgeonnement.

Une hypothèse est donc que les mutations introduites pour le mutant 2 perturbent la polymérisation normale de la protéine, ce qui expliquerait la perte de l'effet de dominance-négative.

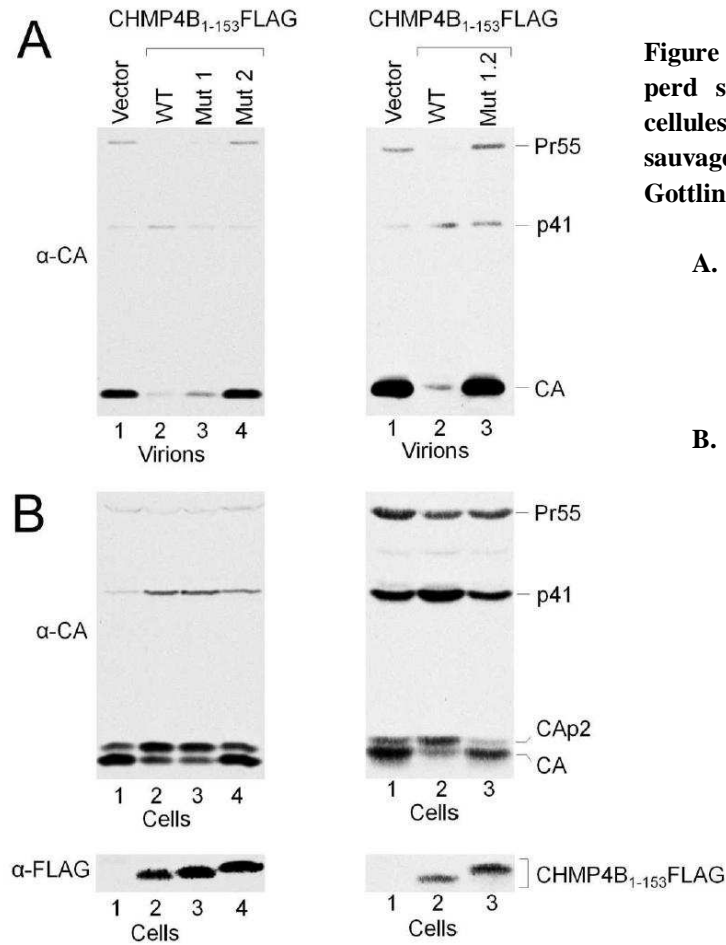


Figure 38 : le mutant CHMP4B1-153 FLAG mut2 perd son effet de dominance négative dans des cellules 293T, avec un plasmide codant pour HIV-1 sauvage. (expérience réalisée par l'équipe de H. Gottlinger, Umass, en collaboration)

- A. Le western blot met en évidence la libération de virions dans le milieu, après séparation par gradient de sucrose, et donc la perte de l'effet de dominance-négative après transfection de la construction tronquée CHMP4B_{Mut2}.
- B. La maturation de la polyprotéine gag dans les cellules infectées est perturbée pour le mutant 2, tandis que le mutant 1 est semblable au contrôle. Le niveaux d'expression des différentes constructions est établi sur un second blot, à partir d'anticorps anti-FLAG.

La troisième répétition DM14 (CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅) interagit avec une construction comprenant seulement les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de CHMP4. Les prédictions bioinformatiques sur ce fragment CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ par le logiciel PSIPRED rendent également compte de la présence de **trois hélices α** , en accord avec les données enregistrées par dichroïsme circulaire. Une prédiction de structure tridimensionnelle par le serveur en ligne QUARK (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/QUARK/>) suggère la présence d'une épingle formée par les deux premières hélices α (**voir figure 39**).

Dans ce modèle, la seconde hélice correspondrait à la seconde région conservée du motif DM14 : des mutations introduites dans cette hélice potentielle **abolissent l'interaction CC2D1A/CHMP4B** sur la base d'expériences de pulldown. Les résidus mutés ont été identifiés en sélectionnant des régions conservées entre espèces, mais non entre répétitions d'une même protéine. Ils ont donc été choisis uniquement sur la base d'alignements de séquence, en l'absence de structure cristallographique. Dans le modèle proposé par Quark, ces résidus sont toutefois **accessibles au solvant**, ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle la région 374-393 de CC2D1A est importante pour cette interaction. D'après ce modèle, la région 416-455, pourtant non incluse dans le motif DM14, aurait ici un rôle **structural** ; rétrospectivement, ceci pourrait expliquer la perte d'interaction de la construction CC2D1A₃₄₆₋₄₁₆ par ITC, alors même que la région 416-455 ne lie pas CHMP4B directement. Les répétitions DM14 ont été caractérisées sur la base d'une analyse bioinformatique (Ponting et al., 2001) : cette démarche était semi-automatisée, elle n'était donc pas basée sur des données biochimiques. En particulier, les répétition de motifs au sein d'une même protéine rend problématique leur délimitation. En l'état ces données suggèrent donc que d'autres résidus aux extrémités de la troisième répétition DM14 (en N- ou C-terminal) puissent contribuer modestement à cette interaction.

7.2 Rôle de CC2D1A au niveau de l'endosome

La littérature rapporte trois sites d'interaction protéine-protéine au sein du système ESCRT-III. Les deux premiers motifs caractérisés concernent les motifs MIM (Kieffer et al., 2008; Obita et al., 2007; Stuchell-Brereton et al., 2007; Yang et al., 2008), ainsi que le site d'interaction avec la protéine Alix (McCullough et al., 2008), soit des interactions avec les parties C-terminales de la protéine. Un troisième mode d'interaction est rapporté par le complexe Vps25-Vps20 ; dans ce dernier cas, Vps25 interagit avec Vps20 par l'extrémité N-terminale de l'hélice $\alpha 1$ (Im et al., 2009).

CC2D1A est un régulateur atypique, en ce sens qu'il est un des premiers régulateurs caractérisés à interagir directement avec la partie N-terminale de CHMP4B, principalement au niveau de l'hélice $\alpha 2$. CHMP4B homopolymérise en formant des filaments (Hanson et al., 2008 ; Pires et al., 2009). A l'inverse de CHMP6 qui a été rapporté comme un activateur de polymérisation in vivo (Teis et al., 2010), CC2D1A se comporte in vitro comme un **inhibiteur de polymérisation** ; ce résultat peut donc être interprété in vivo de deux façons différentes. La première postule simplement que CC2D1A agirait comme un inhibiteur de polymérisation, et que de fait les conditions de l'expérience reflètent bien un phénomène physiologique. La seconde suggère plutôt un rôle de recrutement et/ou d'activation : dans un contexte in vivo, CC2D1A pourrait alors promouvoir la polymérisation de CHMP4B au niveau de certains récepteurs, d'une manière similaire à celle induite par CHMP6.

Au moins deux arguments viennent supporter cette hypothèse.

Le premier est que, in vitro, l'inhibition induite par CC2D1A est modeste, même avec un large excès de peptide; en l'état, et compte tenu de la rapidité du processus de polymérisation (Jouvenet et al., 2010), la capacité d'un tel inhibiteur à contrer in vivo ce phénomène paraît limitée.

Le second est que l'homologue de CC2D1 chez la drosophile, Lethal Giant Discs, semble jouer un rôle dans la régulation du récepteur Notch au niveau des endosomes (Gallagher et al., 2006 ; Childress et al., 2006 ; Jaekel & Klein, 2006). Ici, des mutants LgD tronqués présentent in vitro une persistance du récepteur Notch à la surface des endosomes et une suractivation de cette voie de signalisation. Cette donnée suggère en effet qu'il y ait, chez ces mutants, un défaut dans l'internalisation de Notch dans les ILVs. Par extension, cette donnée suggère également un défaut dans la mise en place d'ESCRT, d'une façon similaire à celle observée chez certains mutants ESCRT-III (Vaccari et al., 2009).

A la lumière des résultats obtenus sur CC2D1A, il est donc tentant d'attribuer ce défaut à une incapacité du mutant LgD à recruter in vivo la machinerie ESCRT vers le récepteur Notch.

7.3 Lien entre CC2D1A et polymérisation de CHMP4B

L'interface impliquée dans l'interaction CC2D1A/CHMP4B est en partie confondue avec une interface requise pour l'homopolymérisation de CHMP4B. En particulier, les expériences de sédimentation sur la construction CHMP4B Δ C_{-Alix} montrent une interaction compétitive en présence d'un excès du peptide CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅. Inversement l'incubation du fragment CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ avec un polymère CHMP4B préformé ne met pas en évidence de cosédimentation du fragment au fond du gradient. Ces données prouvent d'une part que le phénomène d'inhibition est bien lié à la capacité du fragment CC2D1A₃₄₆₋₄₅₅ à interagir avec le monomère CHMP4B et d'autre part que les résidus impliqués dans cette interaction ne sont pas ou peu accessible sous la forme polymérique.

Cette interaction a donc des propriétés distinctes de celles relatives à Alix (Pires et al., 2009) ou VPS4 (Lata et al., 2008), qui vont au contraire cosédimenter avec des polymères CHMP4B et CHMP2A/CHMP3 respectivement.

Le fragment CHMP4A₁₋₁₁₆ constitue la forme minimale susceptible de former un polymère CHMP4B in vivo (Hanson et al., 2008). Cette construction ne comprend que les hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$ et **potentiellement $\alpha 3$** . La cristallisation d'une forme de CHMP4B proche de cette construction est donc susceptible de mettre en évidence d'authentiques interfaces de dimérisation. Cette approche avait déjà été employée dans le contexte de la protéine CHMP3 (Muziol et al., 2006 ; Bajorek et al., 2009), sous ses formes complètes ou tronquées en C-terminal. En particulier, une interface de polymérisation **de type boucle-boucle** faisant intervenir la région **opposée** à celle couverte par l'hélice $\alpha 5$ avait été impliquée dans la formation du polymère CHMP2A-CHMP3. Il est donc possible qu'une seconde interface, jusqu'ici négligée, soit présente à l'autre extrémité de l'épingle dans le cas de CHMP4B (**voir figure 40**).

Les trois résidus **E90**, **E94** et **E97**, impliqués dans l'interaction CHMP4B/CC2D1A, sont présents sur la face libre de $\alpha 2$, et ne sont donc pas masqués par les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$: cette donnée est cohérente avec le fait que CC2D1A puisse interagir in vivo et in vitro avec des constructions possédant ces deux hélices.

Par ailleurs les données tirées des tests de bourgeonnement montrent que cette interface est importante pour la fonction de CHMP4B, et impliquée dans le phénomène de dominance-négative,

suggérant de façon indirecte un rôle de cette région dans la polymérisation. En l'état, les trois résidus **E90** ; **E94** et **E97** impliqués dans ce travail sont cependant distincts des quatre résidus **EVLK₁₀₄₋₁₀₇** identifiés par Morita (Morita et al., 2011) pour l'interaction CHMP4B-CHMP2A. (**voir figure 41**)

En l'état, il se peut cependant que l'impact de ces mutations sur le bourgeonnement du VIH ne soit qu'**indirectement** lié à un défaut de polymérisation, par exemple en déstabilisant cette région de l'hélice. Des tests préliminaires ont montré qu'un mutant 1.2 MBP-CHMP4B Δ C-_{Alix} ne liant plus CC2D1A était capable de former des filaments *in vitro*, mais leur aspect diffère **sensiblement** en microscopie électronique des filaments formés par la construction native.

Un aspect de ce travail qui mériterait donc d'être précisé plus directement concerne le mode de polymérisation de CHMP4B. Dans cette optique, il serait intéressant de muter de façon ciblée des résidus impliqués dans l'interface mise en évidence par PISA.. En particulier, il serait pertinent de retester la **localisation in vivo de ces différents mutants** ainsi que leur impact sur certains processus cellulaires, notamment la cytokinèse et la régulation du récepteur Notch.

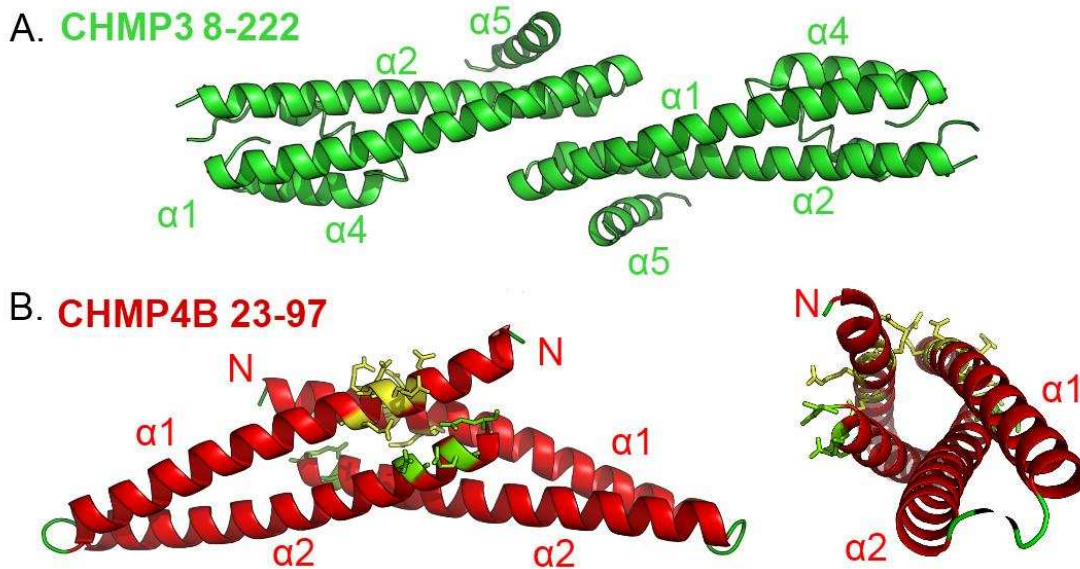


Figure 40 Détail du dimère cristallographique identifié par PISA, avec les positions des deux jeux de mutation testés dans cette étude, Mut1 (en jaune) et Mut2 (en vert).

A. Interface boucle-boucle identifiée dans le cristal CHMP3₈₋₂₂₂ (Bajorek et al., 2009)

B. Mut2 est préférentiellement impliqué dans l'interaction CC2D1A/CHMP4B, ainsi que dans l'effet dominant-négatif des constructions CHMP4B Δ C sur le bourgeonnement du HIV. L'interface CHMP4B-CHMP4B prédite par PISA est distincte de celle retrouvée pour CHMP3 (**PDB: 3FRT**)

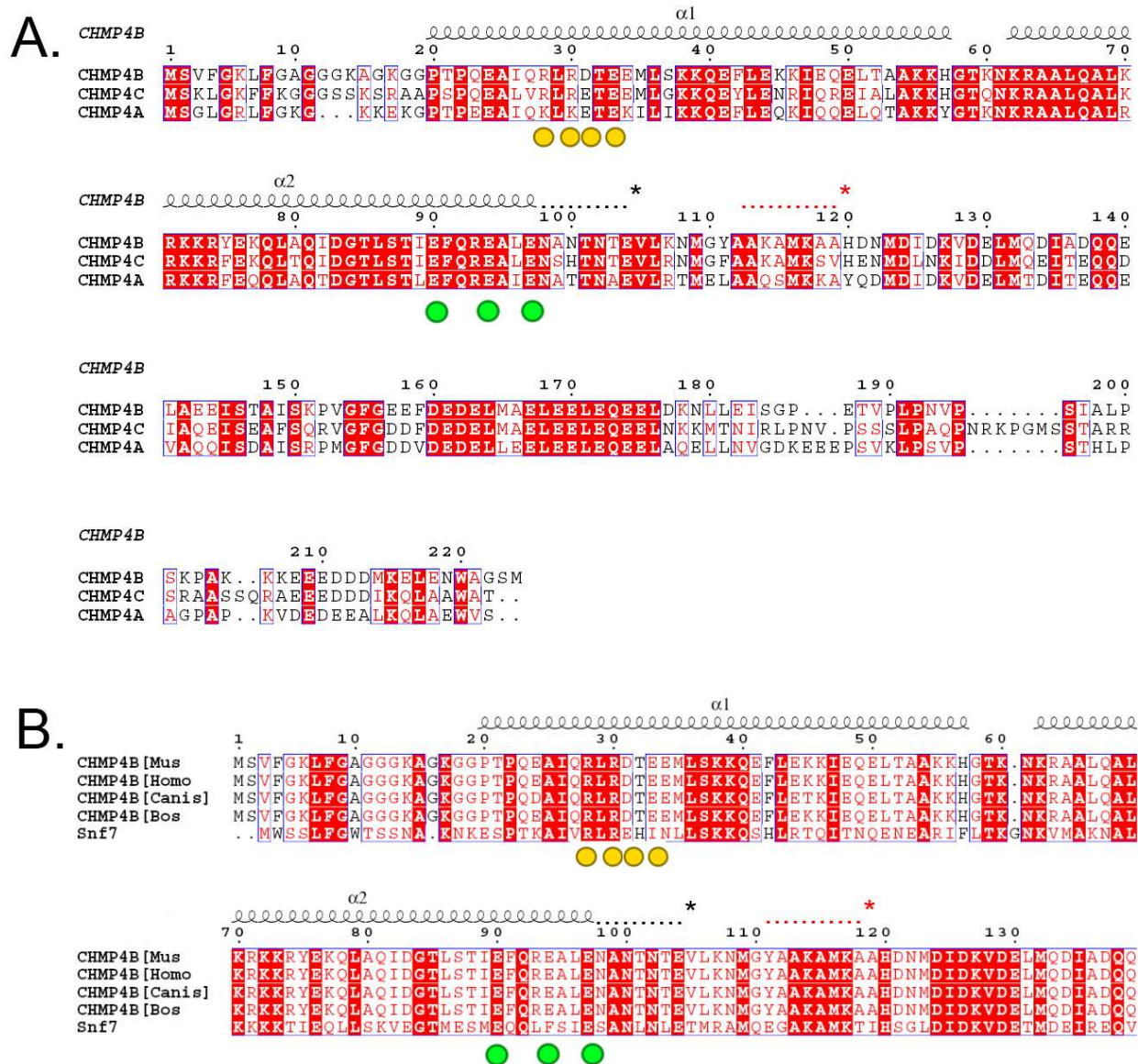


Figure 41. CHMP4 est fortement conservé entre espèces, ainsi qu'entre isoformes.

- A. Alignement des trois isoformes de CHMP4 chez l'homme.
- B. CHMP4 est conservé entre espèces. Figurent ici les séquences primaires de CHMP4B chez l'homme, la souris, le chien, la vache et la levure (Snf7).

Les résidus mutés chez le mutant Mut1 sont marqués en jaune. Les résidus mutés chez le mutant Mut2 sont marqués en vert. La limite théorique de l'hélice $\alpha 2$, telle que prédite par l'alignement de structure, est marquée d'une astérisque noire. La limite de la construction CHMP4A₁₋₁₁₆ capable de polymériser in vivo (Hanson et al., 2008) est marquée d'une astérisque rouge.

7.4 Modèle d'activation de CHMP4B en deux temps.

Comme le suggère la structure cristallographique de CHMP4B, la base de l'épingle formée par $\alpha 1$ et $\alpha 2$ est **potentiellement** impliquée dans la polymérisation, car l'interaction de CC2D1A avec cette région empêche la polymérisation normale de la protéine sauvage. Or nous savons qu'un fragment minimal CHMP4A₁₋₁₁₆ est susceptible de former des filaments *in vivo* lorsqu'il est surexprimé en cellules de mammifères (Hanson et al., 2008) : ces deux éléments suggèrent donc que la structure en épingle à cheveux formée par $\alpha 1$ et $\alpha 2$ constitue **le cœur du polymère CHMP4B**. Or nous savons, à partir des données relatives à l'autoinhibition des protéines CHMP, que l'hélice $\alpha 5$ masque une ou plusieurs interfaces de polymérisation au niveau de la **boucle** de l'épingle. Cette hélice $\alpha 5$ étant donc située à distance de la région mise en évidence dans ce travail (la **base** de l'épingle), je propose que $\alpha 3$ et $\alpha 4$ aient également un rôle d'autoinhibition, conduisant ainsi à un modèle d'activation de CHMP4B **en deux étapes**.

Ce modèle postule l'existence d'au moins deux interfaces de polymérisation distinctes, soit l'interface définie dans le cristal mais également une interface dite boucle-boucle, telle que proposée par l'équipe de Sundquist (Bajorek et al., 2009) et Muziol (Muziol et al., 2006) pour CHMP3 et masquée potentiellement par $\alpha 5$. L'activation de ces deux interfaces se ferait de façon **indépendante, mais éventuellement coordonnée**, au moment du recrutement de CHMP4B à la membrane.

Je propose ici que l'activation de CHMP4B par CHMP6 (et potentiellement CC2D1A) devrait s'accompagner d'un **changement conformationnel**, avec dissociation des hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$. Cette assertion pourrait être étudiée par l'utilisation de sondes fluorescentes à ce niveau, comme une précédente étude l'avait faite pour CHMP6 (Teis et al., 2010). Cette activation correspondrait à la formation d'un premier dimère, d'une longueur approximative de 7 nm, et large d'environ 2-3 nm, en accord avec les données de la littérature sur les dimensions du polymère ESCRT-III. L'activation de la seconde interface se ferait par dissociation de l'hélice $\alpha 5$. De façon accessoire, la forme dimérique de Alix (Pires et al., 2009) pourrait favoriser ce phénomène en interagissant avec la partie c-terminale de CHMP4B. Cette seconde activation favoriserait ainsi la formation d'un tétramère CHMP4B, par association de deux dimères. L'hélice $\alpha 5$ étant, à cette étape, dissociée du reste de la protéine, elle pourrait interagir avec VPS4 qui pourrait ainsi imposer des contraintes au polymère naissant, en particulier son diamètre (Shestakova et al., 2010).

La seconde interface de polymérisation est ici supposée être une interaction de type boucle-boucle, mais les résidus impliqués ne sont pas définis précisément; cette incertitude est susceptible de faire varier le diamètre du polymère final de façon conséquente. Compte tenu des dimensions du dimère CHMP4B, il est raisonnable de supposer ici un diamètre minimal d'environ 20 nm. Sur la base des images de microscopie électronique des polymères CHMP4B (voir chapitre V, ainsi que Hanson et al., 2008), le diamètre maximal de ces structures pourrait atteindre 50 nm environ ; de fait, il existe un facteur 2 entre ces deux valeurs, ce qui suppose pour au moins une de ces interfaces une flexibilité importante.

Une étude précise des caractéristiques de ces polymères, couplée à une meilleure connaissance des interfaces de polymérisation CHMP4B-CHMP4B permettrait de préciser ce modèle. Ici, le rôle de CHMP2 ou de CHMP3 n'est pas pris en compte ; en reprenant le modèle du dôme (Fabrikant et al., 2009 ;

Peel et al., 2010), l'une ou l'autre de ces protéines serait ainsi directement recrutée par CHMP4 et VPS4, et s'assemblerait au niveau de la membrane plasmique pour compléter la fission. (voir figure 42)

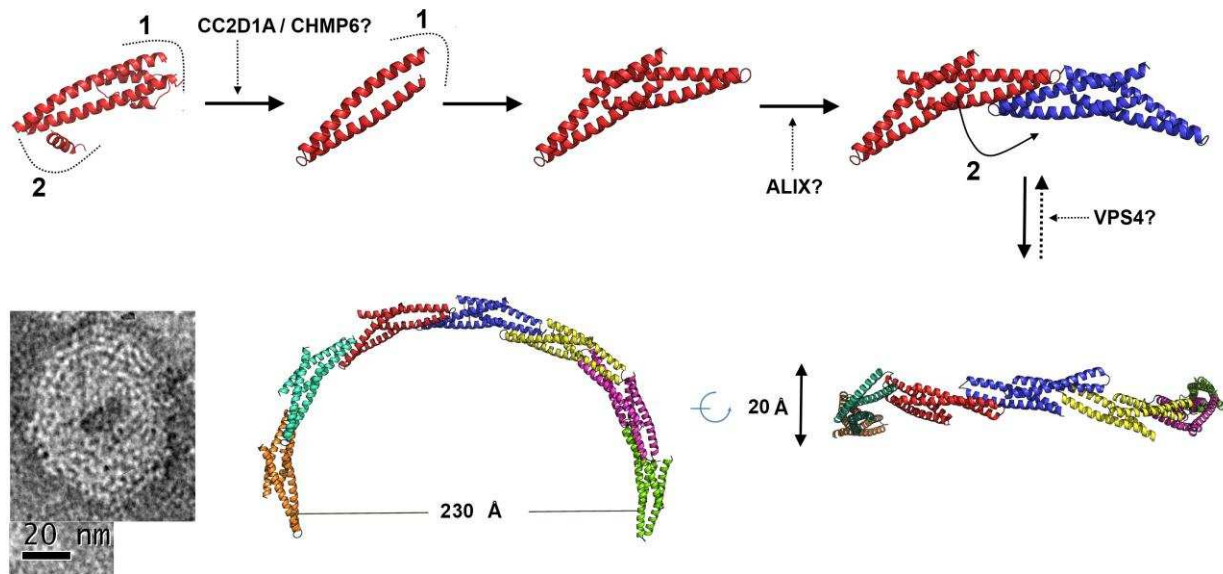


Figure 42 : modèle d'activation de CHMP4B et polymérisation.

Le modèle proposé ici prend en considération **deux interfaces de polymérisation**.

L'interface 1, mise en évidence dans la structure cristallographique de CHMP4B, est masquée par les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$. **L'interface 2**, proposée par l'équipe de Sundquist pour CHMP3, correspondrait à une interaction « boucle-boucle », masquée en partie par l'hélice $\alpha 5$.

L'interaction de CC2D1A avec CHMP4B active la protéine partiellement, et promeut une forme dimérique. La seconde interface est activée par déstabilisation de l'hélice $\alpha 5$, et promeut la formation du polymère. Les dimensions de l'homopolymère CHMP4B considéré sont en accord avec les dimensions retrouvées à partir des **images EM de polymères CHMP4B-6xHis in vitro** (voir chapitre V pour une analyse détaillée), ainsi que des structures obtenues dans l'étude d'Hanson (Hanson et al., 2008)

VPS4 pourrait jouer un rôle dans la stabilisation d'une troisième interface (latérale ?), ou favoriser l'assemblage d'ESCRT-III à partir d'un premier complexe de taille réduite. Elle pourrait enfin n'intervenir que très tardivement, sur un complexe déjà formé, et induire un changement conformationnel pour le déstabiliser.

CHAPITRE IV – Structure d'un fragment de Lethal Giant Discs

1. Introduction

Au cours de mon stage de Master 2 au laboratoire, j'avais pu travailler sur un protocole de purification d'un fragment de la protéine Lethal Giant Discs (LgD), qui est un homologue proche de CC2D1B, mais qui présente également de fortes homologies avec CC2D1A. Le fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ comprend la fin de la quatrième répétition DM14, la région précédant le domaine C2, le domaine C2 lui-même ainsi qu'une courte séquence c-terminale. Le domaine C2 de LgD ayant une spécificité pour les monophosphoinositides (Gallagher et al., 2006), une hypothèse était que ce dernier pouvait recruter la protéine à la membrane de l'endosome précoce.

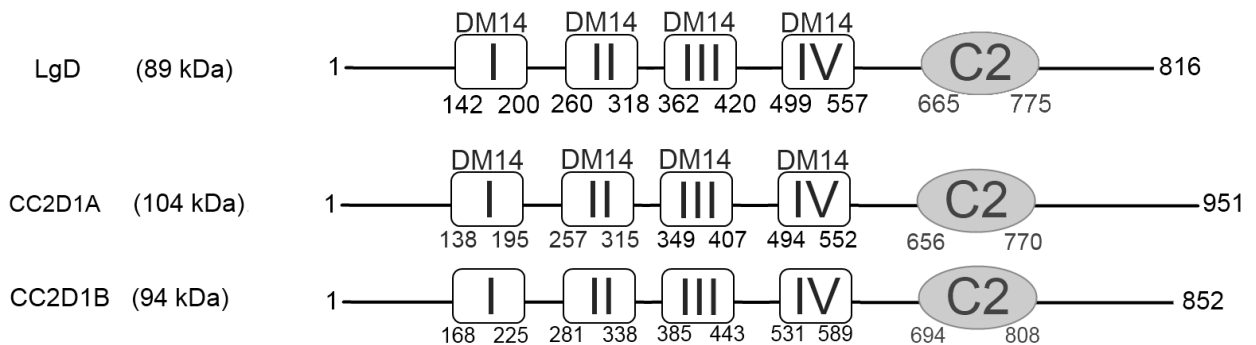


Figure 43: représentation schématique de LgD, CC2D1A et CC2D1B.

Les limites du domaine C2 et des répétitions DM14 sont définies par le serveur SMART.

Durant ce stage j'ai pu obtenir une préparation monomérique et monodisperse du fragment, puis j'ai mis en évidence plusieurs conditions de cristallisation prometteuses. Parmi les conditions initialement reproduites sur le fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆, la composition **PEG 5000 Mm 14%, 0.1M HEPES pH = 7** donne des cristaux en seulement quelques minutes, semblables à de fines plaques, raison pour laquelle cette condition avait été privilégiée. Des cristaux natifs et sélénométhionylés avaient été produits et plusieurs jeux de donnée collectés à 3Å sur la ligne microfocuse de l'ESRF, puis indexés dans le groupe d'espace P21, sur la base des absences systématiques avec une maille de dimensions (a=38.76 b=49.88 c=169.19 $\alpha=90$ $\beta=95.56$ $\gamma=90$). Malheureusement aucune tentative n'avait permis d'aboutir à la résolution de la structure.

En analysant le jeu de donnée plus en détail, j'ai mis en évidence **au début de ma thèse** un maquelage important du cristal : le maquelage (ou « twinning ») survient lorsque deux réseaux cristallins se superposent dans un même cristal. Pour que ce phénomène se produise, chaque réseau considéré doit posséder au moins une dimension en commun avec l'autre, de sorte que les intensités issues de chaque réseau soient partiellement confondues dans le cliché de diffraction. Ici plusieurs indicateurs suggéraient un maquelage parfait (ou « merohedral twinning ») du jeu de donnée: en particulier, un de ces indicateurs concerne la variation du second moment de Z (ou « 4th moment of E ») en fonction de la résolution : il doit être égal à 2 pour un jeu non maquélé et à 1.5 pour un jeu parfaitement maquélé, ce qui est le cas ici. Ce maquelage explique **à postériori** les difficultés rencontrées pour le traitement des données issues de mon Master 2.

Au début de mon doctorat, compte tenu de l'impossibilité de résoudre la structure à partir de ce premier jeu, j'ai cherché à mettre en évidence de nouvelles conditions en reproduisant des cristaux avec une seconde condition jusque là négligée : **PEG 3350 25 %, 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS pH = 6.5.** (voir figure 44)

Des cristaux avaient été initialement obtenus dans cette condition pendant mon année de Master 2, **après protéolyse limitée du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ par la bromélaïne**. Dans cette condition là, les cristaux obtenus poussent à partir de 72 heures, et adoptent après 1 semaine la forme de batonnets nucléant autour d'un même point.

Je suis donc parvenu à reproduire cette condition, **mais avec une forme non digérée du fragment**. J'ai ainsi pu recueillir un premier jeu de données natif à 2.4Å, puis anomal à 2.9Å à partir d'une forme sélénométhionylée de la protéine.

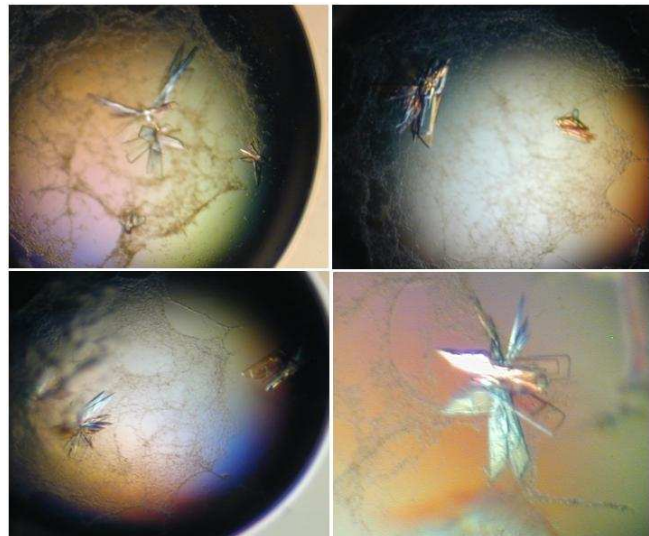


Figure 44 : la forme non digérée du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ cristallise en présence de PEG 3350, 25 %, 0.2 M Ammonium sulfate, 0.1 M BIS-TRIS pH = 6.5

Les cristaux sont obtenus à la fois sur la forme native et la forme sélénométhionylée du fragment.

2. Résolution de la structure du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆.

Le jeu de données natif non maquélé est indexé dans le groupe d'espace P21 sur la base des absence systématiques observées selon l'axe k, avec une maille de dimensions (a=87.64 b=54.17 c=98.29 $\alpha=90$ $\beta=99.76$ $\gamma=90$). Ces valeurs sont très différentes des paramètres de maille des cristaux obtenus à partir de la première condition. En outre, l'intégration des données par le logiciel SCALA ne montre pas d'indicateurs de maquelage. En particulier, la valeur attendue du second moment de Z est ici de 2. En revanche, le remplacement moléculaire par PHASER a échoué en utilisant plusieurs modèles de domaines C2 déjà connus. J'ai donc opté pour un phasage expérimental par le Sélénium.

	LgD SAD (pic)	LgD Natif
<u>Collecte des données</u>		
Groupe d'espace	P2 ₁	P2 ₁
Dimensions de cellule		
a, b, c (Å)	87.08, 53.77, 97.26	87.81, 54.22, 98.19
α, β, γ (°)	90, 99.49, 90	90, 99.49, 90
Resolution	2.9 Å	2.4 Å
R _{merge}	0.086	0.098
I / σ I	7	6
Complétude (%)	97.5% (Ano)	98.85 %
Multiplicité	3.7 (Ano)	3.5
<u>Affinement</u>		
No. reflections		33892
R _{work} / R _{free} (5%)		0.24/ 0.28
No. atomes		3993
Eau		93
<u>R.m.s deviations</u>		
Bond lengths (Å)		0.021
Bond angles (°)		2.207
<u>Ramachandran</u>		
Favorisé/Authorisé (%)		93.6 / 5.6
Défavorable (%)		0.8

Après analyse du spectre de fluorescence sur le cristal contenant la séléniométhionine, un jeu complet de données a été collecté à une longueur d'onde correspondant au pic d'émission du Sélénium (0.9795 Å). Un nouveau jeu de donnée à 2.9 Å, avec des paramètres de maille similaires à l'échantillon natif (a=87.5 b=53.7 c=97.8 $\alpha=90$ $\beta=99.5$ $\gamma=90$). Ce jeu de donnée présente un dommage radiatif important dans les derniers clichés (perte des spots à haute-résolution), ce qui explique pourquoi nous avons opté pour la technique de phasage SAD, plutôt que MAD.

Le jeu de donnée intégré par SCALA correspondant au pic a été soumis au serveur en ligne Auto-RICKSHAW (Panjikar et al., 2005 ; 2009) en suivant la procédure MRSAD, et en imposant deux molécules par unité asymétrique. La section matériel & méthodes décrit plus en détail cette procédure. Le « pipeline » d'Auto-RICKSHAW inclue les étapes de **phasage expérimental (SHELXD)**, **d'amélioration des phases (MLPHARE, DM)** et de **construction automatique du modèle**

(**HELICAP, ARP/wARP, BUCCANEER**). Brièvement, une première phase est déterminée en évaluant la position des atomes lourds (ici le Sélénium). Un premier modèle partiel de la structure est généré automatiquement par Arp/wARP, puis utilisé pour améliorer la qualité des premières phases. Cette procédure est itérative, et conduit donc progressivement à l'amélioration conjointe du modèle et des phases.

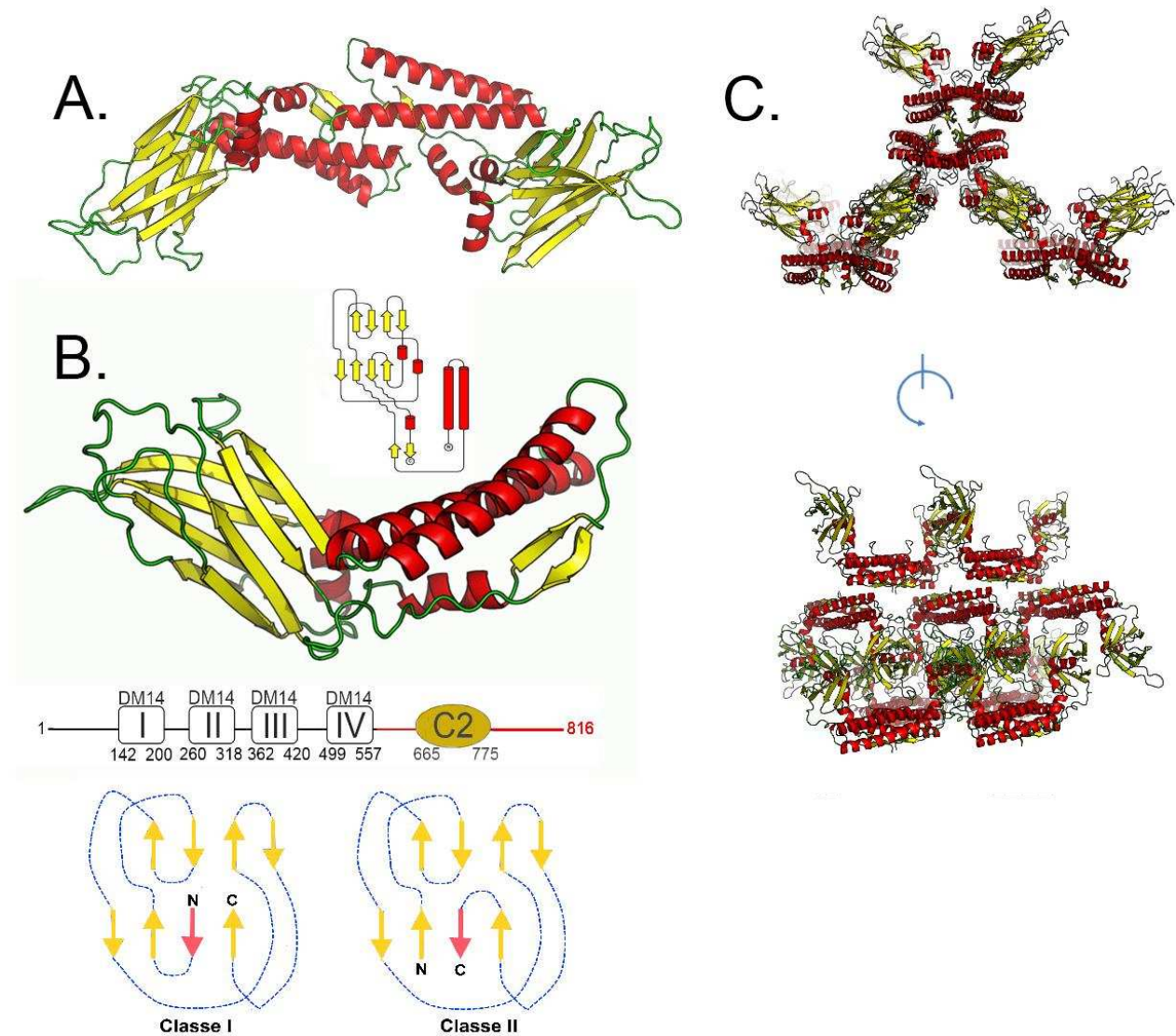


Figure 45 : LgD₅₅₀₋₈₁₆ présente une partie N-terminale hélicale repliée sur la face convexe du domaine C2.

- A. Présentation de l'unité asymétrique et du dimère non-cristallographique.
- B. Fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ sous sa forme monomérique. On observe en C-terminal un domaine C2 bien individualisé, présentant une face convexe (orientée vers la partie N-terminale de la protéine), ainsi qu'une face concave, accessible au solvant. Les deux topologies (classe I et classe II) de domaine C2 rapportées dans la littérature sont décrites.
- C. Etude de l'empilement cristallin. Cet agencement présente un pourcentage inhabituellement élevé de solvant (72%).

Puisque la structure initiale était de faible résolution (2.9Å), le modèle obtenu par la procédure automatique était partiellement incomplet. J'ai notamment pu observer que Arp-wArp semblait incapable d'orienter les brins β présents dans le domaine C2 de la structure, en particulier en raison de la faible densité électronique observable au niveau des boucles flexibles reliant chaque brin. Par ailleurs une des molécules de l'unité asymétrique était très incomplète, ainsi qu'une partie des chaînes latérales. J'ai donc réutilisé le modèle partiel généré par Auto-Rickshaw pour une des molécules, en ne gardant que la chaîne de Ca pour phaser le modèle natif de meilleure résolution (2.4 Å) avec REFMAC 5.5. J'ai ensuite complété ce modèle avec le programme BUCCANEER, plus performant que Arp/wArp pour les données à faible résolution. Après placement des chaînes latérales manuellement avec le logiciel WINCOOT, les molécules d'eau sont ajoutées avec les cartes de différence Fo-Fc et 2Fo-Fc. Les valeurs de Rwork et Rfree (0.24/0.28) sont satisfaisantes à cette résolution.

3. Présentation générale de la structure

L'unité asymétrique comprend deux molécules seulement, avec une proportion de solvant inhabituelle de 72% pour un cristal diffractant à cette résolution. La conséquence est que le réseau cristallin comprend de nombreuses zones sans densité, attribuables au solvant.

La structure de LgD qui a été cristallisée comprend les résidus 550 à 816. Les régions **580-610** et **612-637** forment un faisceau d'hélices α (ou « coiled-coil »), déjà impliquées dans la littérature comme un site potentiel d'interaction avec le promoteur du récepteur de la sérotonine. Ces deux hélices sont reliées au domaine C2 par une région moins conservée d'une vingtaine de résidus.

Le domaine C2 est composé de huit feuillets β antiparallèles, séparés par des boucles flexibles mal définies dans le cristal. Les domaines C2 sont en général impliqués dans des interactions protéine-protéine ou des interactions protéine-membrane. Sur le plan structural, on distingue deux classes de domaine C2, en fonction de l'orientation relative des parties n- et c-terminales. Compte tenu de la topologie des boucles, il s'agit ici **d'un domaine C2 de classe II**, avec le premier et le dernier brin β orientés de façon antiparallèle au centre du premier brin β . **La région 665-795 constitue la totalité du domaine.** La partie convexe du domaine est orientée face à la partie hélicale, tandis que la face concave est accessible au solvant. Ce domaine C2 est atypique, en ce sens qu'il comprend entre les brins 4-5 et 6-7 deux courtes hélices α

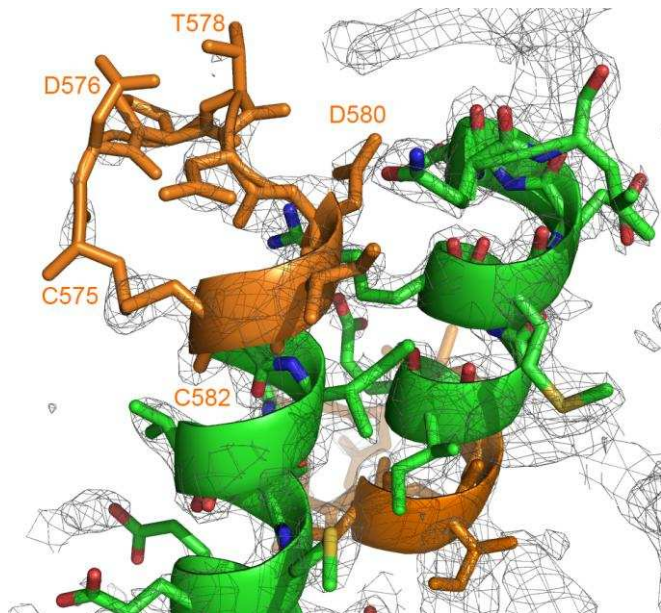


Figure 46 : les résidus C575 et C582 forment un pont disulfure intramolécule dans le cristal.

A 2 σ sur une carte Fo-Fc aucune densité électronique n'est observée en amont de la cystéine 575, ce qui suggère que la région 550-574 est désordonnée dans le fragment.

conservées entre espèces. Bien que les chaînes latérales des boucles séparant chaque brin ne soient pas toutes parfaitement visibles, la position des C α sur la nouvelle carte est en revanche claire.

La partie C-terminale de la protéine, **comprise entre les résidus 796 et 816**, forme une courte hélice, suivie d'une série de résidus hydrophobes venant orienter le faisceau d'hélices en N-terminal contre la face convexe du domaine C2. En outre, les régions 645-648 et 811-814 se structurent en deux courts feuilletts β antiparallèles et stabilisent l'orientation décrite précédemment.

Seuls les résidus de 575 à 816 sont visibles dans la densité : la région 550-574, pourtant comprise dans la construction, n'apparaît pas sur la carte, probablement en raison d'une grande flexibilité. A l'exception de quatre résidus potentiellement impliqués dans la formation d'un brin β , cette donnée semble donc en accord avec les logiciels de prédiction secondaire. Sur la carte de densité on distingue cependant un pont disulfure entre les Cystéines 575 et 582 pour les deux molécules de l'unité asymétrique, malgré la présence d'agent réducteur (**β -mercaptoéthanol**) dans la condition de cristallisation. LgD est présente in vivo dans le cytoplasme et le noyau, et ne possède aucun signal de sécrétion connu : **la présence de ce pont disulfure semble donc artefactuelle. (voir figure 46)**

On observe dans le cristal plusieurs interfaces de dimérisation potentielles. Contrairement à la structure résolue de CHMP4B, rien ne permet ici d'affirmer qu'elles soient physiologiques. **En effet le fragment cristallisé reste monomérique en solution**, comme l'avaient déjà indiquées des données MALLS réalisées au cours de mon stage de Master 2 (données non montrées). Par ailleurs, aucune forme dimérique n'a jamais pu être observée en filtration sur gel, ni ultracentrifugation analytique, même pour des concentrations élevées. Enfin, la protéine élue en gel natif comme une seule et unique bande. En outre, contrairement à la structure de CHMP4B décrite dans le précédent chapitre, **aucune interface n'est ici clairement identifiée par le logiciel PISA**. L'interface principale, formée par les deux molécules de l'unité asymétrique couvre cependant une surface importante de 964 Å², médiée principalement par les extrémités N-terminales du fragment (P-Value de 0,168). Elle implique potentiellement 7 ponts hydrogènes et 8 ponts salins, et pourrait cependant jouer un rôle auxiliaire.

4. Le domaine C2 de LgD pourrait stabiliser LgD à la membrane de l'endosome.

4.1 Le domaine C2 de LgD présente sur sa face concave un site polybasique.

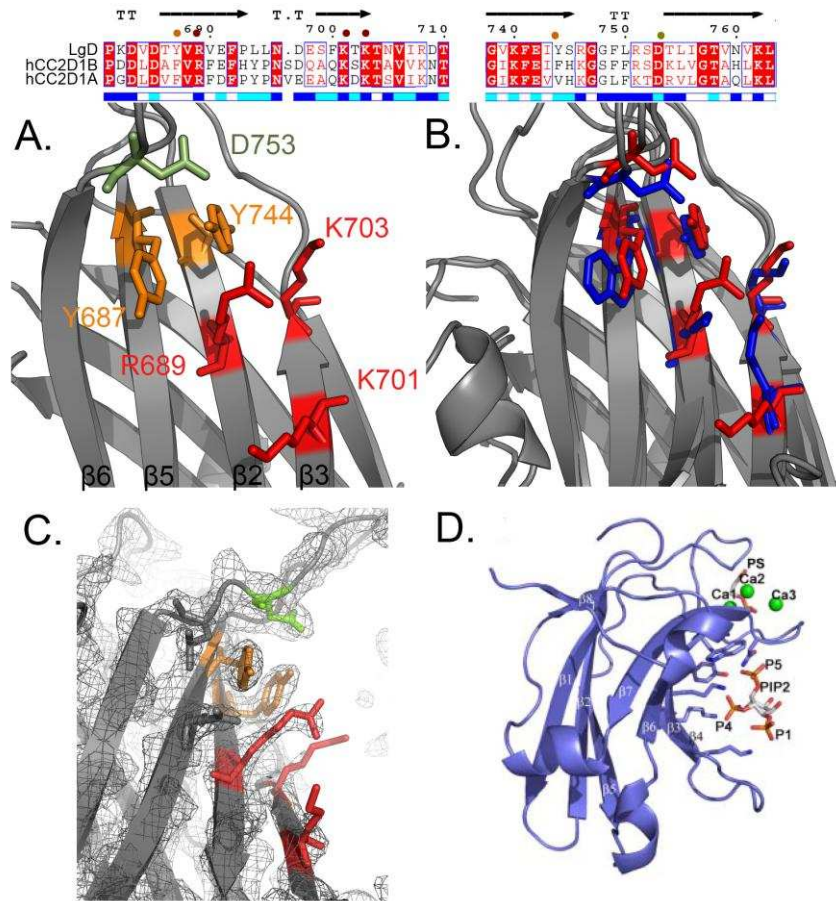
Un mode d'interaction, propre aux phosphoinositides, a été identifié sur la base du domaine C2 de la protéine kinase C α (Guerrero-Valero et al., 2009), où la tête polaire du PI4-5bisphosphate a été cristallisée sur la face concave du domaine C2 au niveau des feuilletts β 4 et β 5. Dans cette structure on distingue en particulier une interaction au niveau de plusieurs résidus basiques (lysine et arginine), formant ainsi un **sillon polycationique** conservé dans la plupart des domaines C2 interagissant avec des phosphoinositides ; cette interaction est directe et n'a à ce jour été décrite que pour des domaines C2 de première topologie.

Bien qu'ils adoptent deux topologies différentes, les domaines C2 de la protéine kinase C α et de LgD ont une structure similaire avec un rmsd de seulement 2.8Å. Le site polybasique décrit par Guerrero-Valero se superpose également parfaitement avec celui de LgD. Le domaine C2 de PKC α ayant été cristallisé en complexe avec la tête polaire du PI4-5 bisphosphate (ici l'inositol triphosphate, ou IP3), ce dernier interagit par le biais des phosphate 1, 4 et 5. Cette interaction est principalement médiée par les

résidus basiques K197, K209 et K211, avec une participation modeste des résidus hydrophobes Y195 et W245 pour la coordination des phosphates 4 et 5. Un cinquième résidu, l'Asparagine 253, contribue modestement en formant un pont hydrogène (3.5Å) avec le phosphate 5 exclusivement. Au total, cinq résidus sont donc impliqués dans cette interaction avec la PKC α . Bien que la structure de LgD ne comprenne, elle, pas d'IP3 ou de myoinositol phosphate, on peut mettre en évidence au niveau du site les correspondances suivantes :

Figure 47a : LgD présente un site potentiel d'interaction avec la membrane.

- A. Le domaine C2 de LgD présente sur sa face concave un site polybasique, composé de résidus très conservés.. L'alignement est réalisé sous ClustalX2, avec les séquences des homologues humains CC2D1A et CC2D1B.
- B. Le site polybasique de LgD (en rouge) se superpose bien avec le site polybasique du domaine C2 de la protéine kinase C α . Une différence notable concerne ici la substitution d'une Asparagine (sur la PKC α) avec un acide aspartique en position 753.
- C. Densité électronique du site à 1.5 σ sur une carte 2Fo-Fc.
- D. Coordination du PIP2 chez la PKC α (tiré de Guerrero-Valero et al., 2009)



Résidu impliqué (PKC α)	Résidu impliqué (LgD)	Interaction IP3 (PKC α)
Y195	Y687	P5
K197	R689	P4, P5
K209	K701	P1
K211	K703	P4
W245	Y744	P5
N253	D753	P5

Figure 48 : correspondances des résidus coordonnant l'IP3 chez la PKC α et LgD

La principale différence concerne donc la substitution d'une Asparagine par un Aspartate en position 753. On notera cependant, d'après les données de la littérature (Gallagher et al., 2006), que le domaine C2 de LgD présente une spécificité pour les monophosphoinositides PI3P, PI4P et PI5P. Il est donc vraisemblable que le site d'interaction ne permette pas ici l'accommodation de trois phosphate, comme dans le cas de l'IP3, mais seulement de deux, à savoir P1 et selon les têtes polaires les phosphates P3, P4 ou P5. La substitution d'une Asparagine par un Aspartate (chargé négativement) pourrait donc expliquer le résultat obtenu en Dot Blot chez LgD, puis confirmé sur CC2D1A.

4.2 Les boucles supérieures décrivent un second motif d'interaction.

On distingue dans la littérature un second mode d'interaction avec la membrane, médié par les trois boucles flexibles (ou « top loops ») séparant chaque brin β . Cette interaction implique des résidus chargés négativement (Aspartate généralement, voire Glutamate ou Asparagine sous certaines conditions), susceptibles de médier une interaction avec plusieurs ions Calcium. Ces ions Calcium vont ensuite pouvoir médier un pont avec une interface acide, par exemple la phosphatidylsérine. On parlera alors d'interaction calcium-dépendante, contrairement à la précédente qui est calcium-indépendante. Pour la protéine kinase $C\alpha$, (Guerrero-Valero et al., 2009) on retrouve au niveau de ces boucles trois atomes de Calcium ainsi qu'une densité additionnelle attribuée à une phosphosérine. Ici, le schéma de coordination fait intervenir cinq résidus Aspartate coordonnant au total deux ou trois ions Calcium.

En reproduisant cet alignement avec le domaine C2 de LgD je parviens aux mêmes conclusions, puisque ces résidus **ne sont pas strictement retrouvés chez LgD (voir figure 49-A)** : cette différence est en partie liée à la présence d'un court motif en amont du brin β_3 , comprenant deux résidus Aspartate strictement conservés chez l'humain et la drosophile. En outre, ces résidus Aspartate (D683, D685, D709) sont impliqués dans la formation d'une poche susceptible d'être un site d'interaction similaire à celui de la PKC α .

Malheureusement aucune densité électronique attribuable à un ion Calcium n'a été identifiée dans le cristal à cet endroit, et la condition de cristallisation ne comprenait également pas de calcium ou autre ion potentiellement concerné par ce schéma de coordination. La difficulté à reproduire un cristal non maqué à partir du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ a en outre empêché la résolution de la structure en présence de calcium.

Bien que l'organisation générale du domaine C2 de LgD diffère de celle du domaine C2 de PKC α , elle présente cependant des motifs similaires. En l'état, la structure du fragment tendrait donc à confirmer un rôle du domaine C2 dans le recrutement de LgD directement à la membrane de l'endosome.

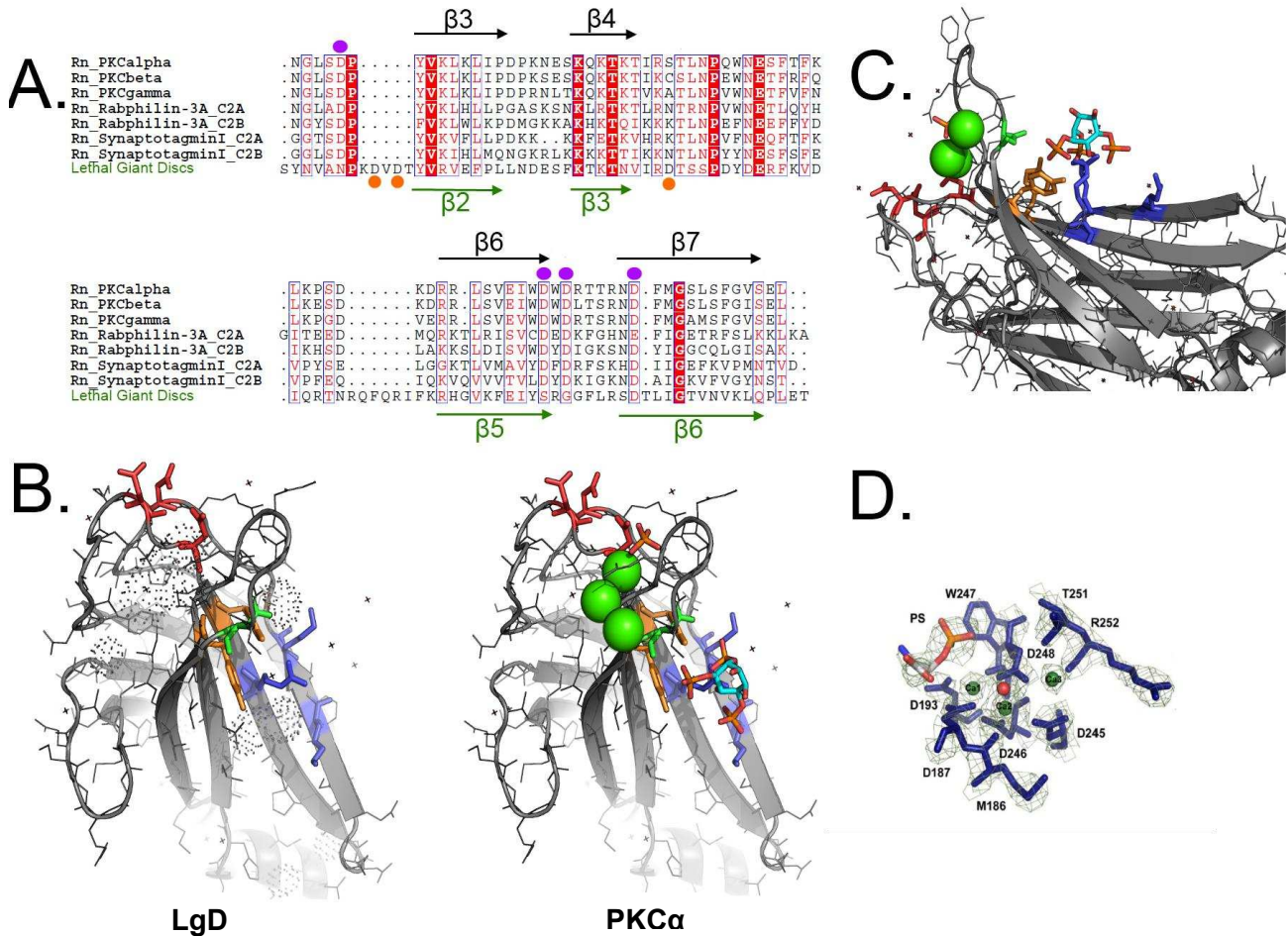


Figure 49 : LgD présente au niveau des boucles supérieures deux poches susceptibles de médier des interactions calcium-dépendantes.

- A. Alignement de domaines C2 calcium-dépendants. Pour les domaines C2 de topologie I, l'interaction avec les ions Calcium est médiée par 4 à 5 résidus Aspartate. Sur la base de l'alignement de structure, ces résidus Aspartate ne sont pas conservés chez LgD. En revanche, le domaine C2 de LgD diffère par la présence d'un court motif en amont du feuillet β2 (« **KDVDT** ») susceptible de compenser la perte des autres Aspartates.
- B. LgD présente deux poches formées par les boucles supérieures, encadrées par plusieurs résidus Aspartates strictement conservés chez l'homme, ou mutés en Asparagine. (**gauche**). La superposition du domaine C2 de LgD et de PKCα (**droite**) montre que les atomes de Calcium coordonnés se situent à proximité des poches prédites précédemment.
- C. Vue de côté des deux sites potentiels d'interaction chez LgD.
- D. Schéma de coordination des trois ions Calcium et de la phosphosérine sur la structure de la PKCα (tiré de Guerrero-Valero et al., 2009)

4.3 Le fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ n'interagit pas in vitro avec des liposomes.

Afin de **confirmer** l'interaction du domaine avec des membranes lipidiques, j'ai d'abord testé la construction par flotation, avec des liposomes de différentes composition, et selon un protocole similaire à celui utilisé pour les constructions CHMP2B (voir chapitre V). Sur toutes les compositions de liposomes testées, je ne retrouve en revanche pas de flotation marquée du fragment en haut du gradient. Que ce soient pour des compositions simples (**80% SOPC/20% DOPS** ou **67% SOPC / 33% DOPS**) ou en présence de phosphoinositides (**70% SOPC / 25% Cholesterol / 5% PI_{3,5}P** ; **66% SOPC / 31% DOPS ; 2% PI₄P**), la protéine reste dans la partie inférieure du gradient, y compris en présence de 20mM Ca²⁺. LgD interagissant avec le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI₄P) en Dot Blot, j'ai ensuite testé en solution une interaction avec l'analogue de la tête polaire du phosphatidylinositol 4-phosphate, le myo-inositol 4 phosphate. Aucune interaction n'a été retrouvée avec cette technique, même en présence de calcium.

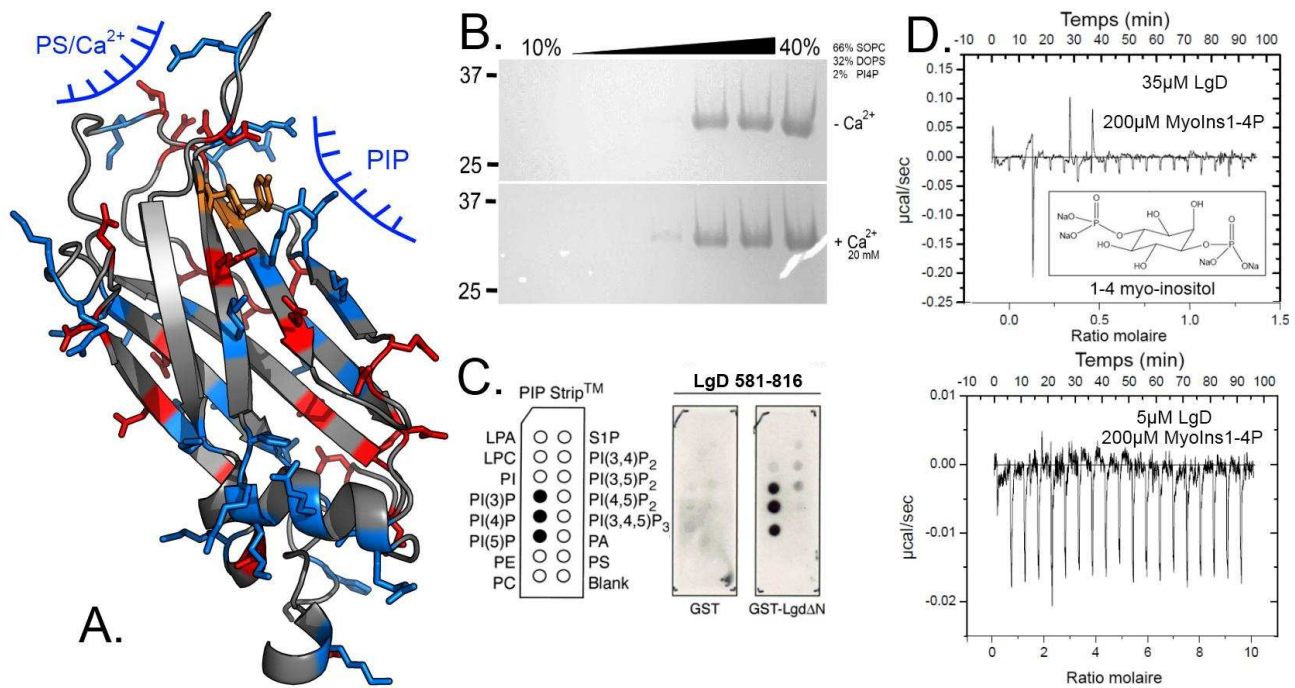


Figure 50: le fragment LgD 550-816 n'interagit pas, ou peu, avec la tête polaire du PI₄P in vitro, même en présence de calcium et de phosphatidylsérine.

- Schéma représentant les deux sites potentiels d'interaction du domaine C2 avec la membrane.
- Test de flotation, en présence ou en absence de Calcium, du fragment avec des liposomes contenant du PI₄P (Avanti Lipids).
- (d'après Gallagher et al., 2006) Interaction du fragment c-terminal avec différents types de lipides par Dot Blot.
- Etude par ITC de l'interaction entre le fragment et un analogue de la tête polaire du PI₄P.

En l'état les données expérimentales sont donc très contradictoires. Le fragment de LgD/CC2D1A comprenant le domaine C2 présente une spécificité pour les monophosphoinositides ; ce résultat a été identifié sur deux homologues et par deux équipes différentes (Gallagher et al., 2006 ; Chang et al., 2010). Or aucune interaction claire n'a pu être identifiée dans ce travail par ITC ou flotation. Une possibilité est donc que l'interaction de LgD avec des monophosphoinositides in vitro ne reflète pas une propriété **physiologique** du domaine (qu'elle soit donc artefactuelle). La reproductibilité de ce résultat sur deux protéines homologues par Dot Blot (figure 50C ; Chang et al., 2010, communication personnelle), ainsi que la présence d'un site polycationique dans la structure cristallographique ne plaident pas en faveur de cette explication.

Le serveur Dalilite permet de classier, à partir d'une structure donnée, les domaines ou protéines les plus proches en terme de repliement de leurs C α ; cette classification peut permettre d'identifier des motifs communs à des protéines **dont la fonction est déjà connue**. Parmi les domaines C2 résolus dans la littérature, le serveur identifie une liste domaines C2 proches de celui de LgD ; ce résultat n'est pas surprenant compte tenu de la forte homologie de structure entre tous ces domaines.

La structure la plus proche concerne le premier domaine C2A de l'Ortoferline, récemment résolu (Helfmann et al., 2011) (Z-score = 15.1), ainsi que le domaine C2B de Munc13 (Z-score = 14.6), qui possèdent tous deux une topologie de type II. On retrouve également des domaines C2 de topologie I parmi les premières solutions, en particulier le domaine C2 de la phospholipase C Delta1 (Z-score = 13.9), ou encore le domaines C2 des protéines E3 ubiquitine-ligase NEDD4-like et ITCH (Z-score = 13.6) déjà impliquées dans l'ubiquitination de la polyprotéine gag chez HIV et HTLV respectivement. Globalement ces domaines présentent **des différences importantes** dans leur capacité à interagir avec des membranes biologiques. Si le premier domaine C2 de la myoferline présente une interaction avec la phosphatidylsérine et les phosphoinositides calcium-dépendante, aucune interaction n'a été en revanche identifiée pour le premier domaine C2 isolé de l'Ortoferline ; dans ce dernier cas, le domaine ne présente cependant **ni la région polybasique, ni la poche d'aspartate** décrites précédemment.

Le domaine C2 de Nedd4 a été impliqué à la fois dans des interactions protéine-membrane et protéine-protéine: un premier article rapporte ainsi une interaction entre ce domaine et des liposomes (Plant et al., 1997) calcium-dépendante. Deux publications plus récentes rapportent des interactions protéine-protéine ; ce domaine pourrait jouer un rôle d'autoinhibition de l'activité E3 ubiquitine ligase de Nedd4 (Wang et al, 2010), et/ou de recrutement par la protéine GRB10 (Huang et al., 2010). **Ces trois fonctions ne sont pas**

Chaîne	Z-score	Rmsd (Å)	Aligned res.	% id.	Nom C2	Type	Int. Lipides?	Calcium-dep.?
3L9b-A	15.1	1.7	118	19	Otoferlin	II	-	-
3kwt-A	14.6	2.2	114	22	Munc13-C2B	II	PI	Oui
2isd-A	13.9	13.7	160	16	Phospholip. C	I	PS/PI	Oui
2dmh	13.7	2.5	122	18	Myoferlin	II	PS/PI	Oui
2nsq-A	13.6	2.5	118	24	NEDD4-like	I	?	?
2nq3-A	13.6	2.3	118	23	ITCHY	II	?	?

Figure 51 : domaines C2 les plus proches du domaine C2 de LgD (Dalilite).

mutuellement exclusives.

5. Caractérisation et cristallisation de fragments étendus de LgD

Suite à la résolution de cette structure, j'ai cherché à produire des formes étendues de LgD afin de les cristalliser ; l'objectif principal était de résoudre la structure d'une répétition DM14. J'ai d'abord concentré mes efforts sur la forme complète de la protéine. La taille prédite de la protéine est de 89 kDa, mais une bande correspondant à 130 kDa avait été mise en évidence dans des précédentes études sur des larves de drosophile (Gallagher et al., 2006). Des tests d'expression de CC2D1B-FLAG en cellules HEK293 ont également mis en évidence une bande unique éluant à 130kDa, à partir de transfections sur des plaques 6 puits (54cm²), **ce qui montre une mobilité aberrante en SDS-PAGE de la protéine complète.**

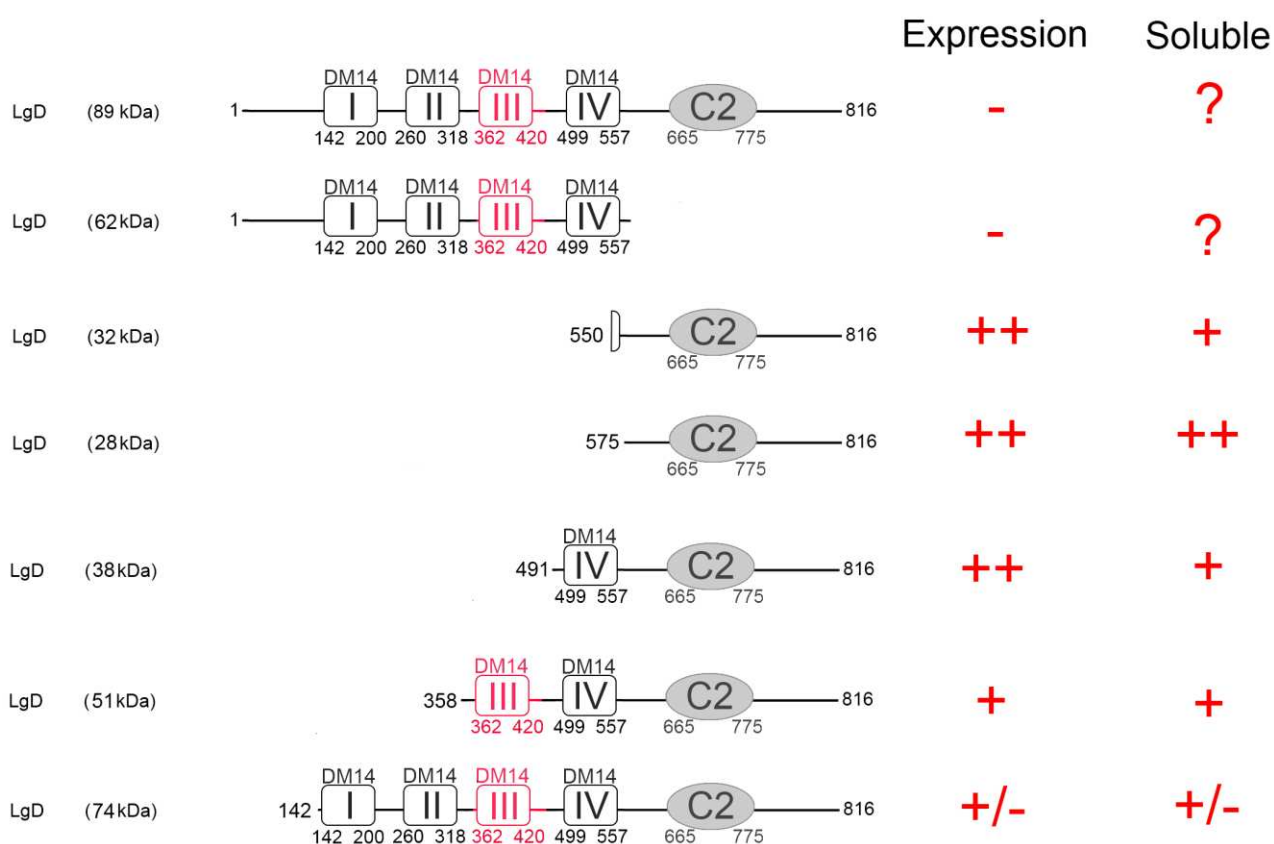


Figure 52 : schéma des différentes constructions utilisées pour l'étude en système d'expression bactérien (E.Coli BL21 ou Rosetta)

Bien que la protéine soit purifiable en petites quantités par ce protocole, les rendements sur des volumes de cultures plus important (175 cm²) se sont révélés décevants, et inadaptés pour atteindre les quantités requises de protéines nécessaires à des tests de cristallisation.

Afin d'obtenir une construction en quantités suffisantes et facilement purifiable, j'ai fait plusieurs tentatives d'expression d'une construction LgD clonée dans le vecteur pProexhtB, avec une étiquette 6xHis en n-terminal, sur des souches E.Coli BL21 et Rosetta. Une bande migrant à 37 kDa est clairement induite sur cette construction, et élue préférentiellement à 250 mM Imidazole sur une colonne Ni-NTA. En revanche je ne retrouve pas de bande clairement induite pour la forme complète de LgD. Je note toutefois l'élution précoce de 4 fragments à 50 mM Imidazole, avec une bande migrant à environ 100 kDa. En revanche, seule la bande induite à 37 kDa donne clairement un signal avec les anticorps anti-Histidine. Une hypothèse est donc que la protéine LgD soit faiblement exprimée, que la construction présente un problème de stabilité et/ou de traduction avortée. En particulier, la présence de plusieurs codons rares à l'extrémité n-terminale du gène LgD pourrait expliquer ce faible rendement chez E.Coli.

Afin de replacer la structure du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ dans le contexte des répétitions DM14, j'ai donc décidé de tester de nouvelles constructions élargies comprenant les troisième et quatrième répétitions DM14.

Cette étude pouvait se faire de deux façons différentes : la première était de produire des cristaux comprenant une répétition DM14, seule ou en complexe avec CHMP4B. Une seconde était de générer un modèle basse-résolution de fragments étendus par diffusion de rayons X au petits angles (SAXS). Pour cette seconde approche l'idée était également d'introduire individuellement chaque répétition, de structure inconnue, en gardant pour référence la partie c-terminale désormais connue; **cette approche a pour mérite de permettre une meilleure orientation de chaque domaine ou motif par rapport aux autres.**

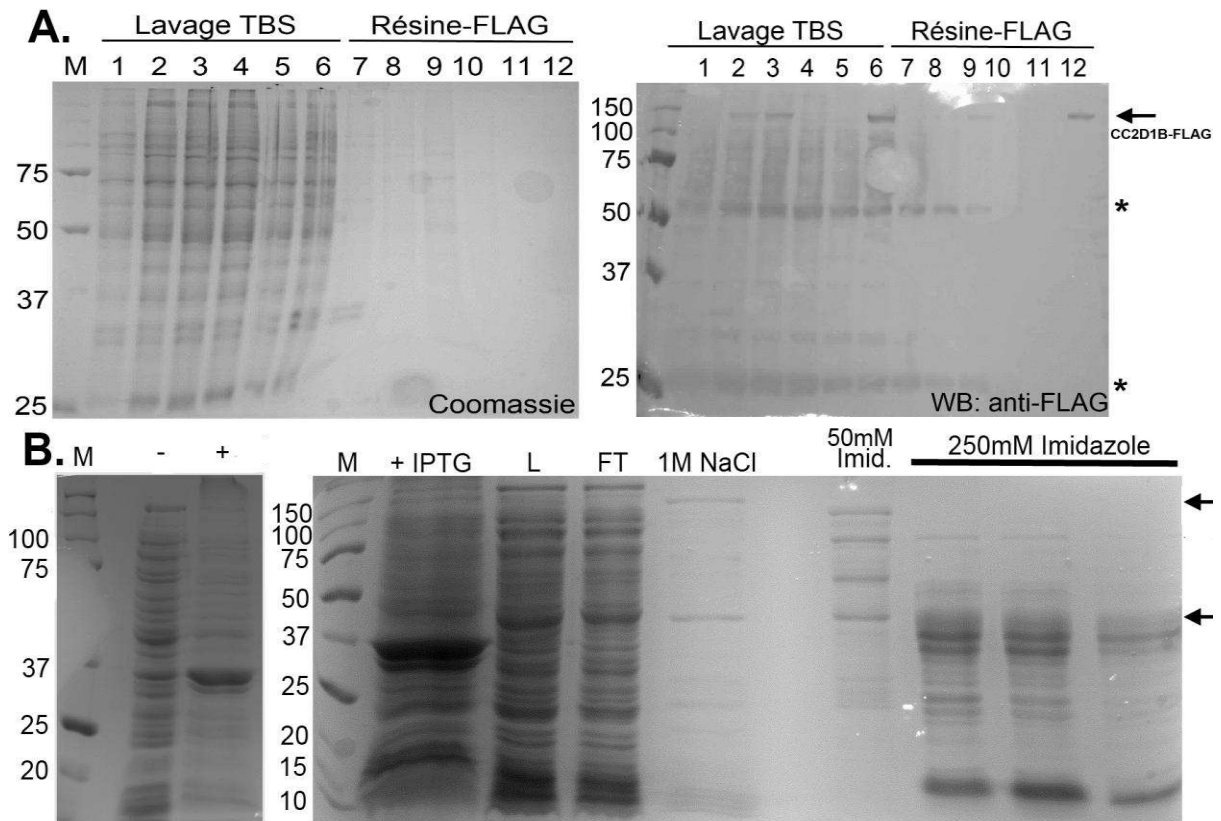


Figure 53: la protéine LgD/CC2D1B présente une mobilité aberrante par gel SDS-PAGE. Elle est faiblement exprimée chez E.Coli, et se dégrade rapidement pendant le protocole de purification.

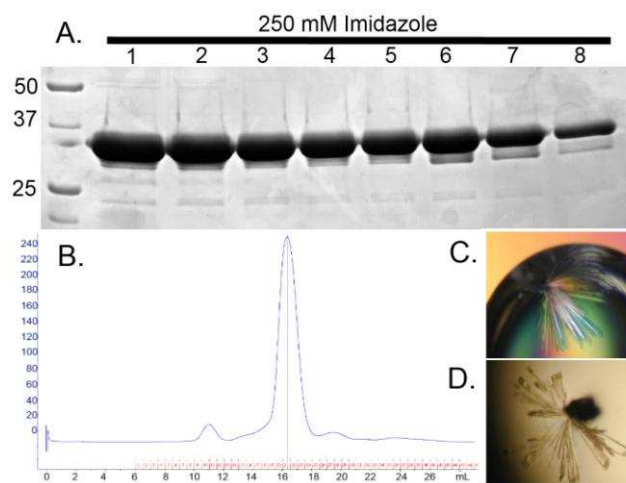
- A.** Transfection de cellules HEK293 EBNA avec un plasmide codant pour CC2D1B-Flag. La protéine est purifiée après 2 jours avec une résine anti-FLAG M2, puis éluee avec une solution TBS contenant le peptide FLAG à 100 µg/mL. Les échantillons sont révélés après migration sur gel SDS-PAGE par coloration au Coomassie et Western Blot en présence d'anticorps anti-FLAG. Les astérisques marquent les bandes de l'IgG monoclonale de souris complexée aux billes d'agarose.
- 1-7 : transfection 1µg de plasmide (ratio ADN/PEI = 1 / 0.5)
 - 2-8 : transfection 1µg de plasmide (ratio ADN/PEI = 1 / 1)
 - 3-9 : transfection 1µg de plasmide (ratio ADN/PEI = 1 / 2)
 - 4-10 : transfection 2µg de plasmide (ratio ADN/PEI = 1 / 0.5)
 - 5-11 : transfection 2µg de plasmide (ratio ADN/PEI = 1 / 1)
 - 6-12 : transfection 2µg de plasmide (ratio ADN/PEI = 1 / 2)
- B.** Purification de LgD exprimée dans la souche E.Coli Rosetta, après induction sur 3.5h avec 1mM IPTG. Seule une bande migrant à 37 kDa est fortement induite. Après purification sur résine Ni-NTA, quatre bandes éluees faiblement à 50 mM Imidazole. La bande induite à 37 kDa élue plus tardivement à 250 mM Imidazole et est reconnue par un anticorps anti-histidine.

5.1 Purification et cristallisation de LgD₅₇₅₋₈₁₆

Afin de valider la structure du fragment en solution, j'ai tout d'abord reclone le fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆ en enlevant la partie non-visible dans la densité électronique, afin d'obtenir la construction LgD₅₇₅₋₈₁₆. La construction est bien exprimée et élue en filtration sur gel comme un monomère ; l'état monomérique du fragment a été également confirmé par ultracentrifugation analytique (données non montrées). Cette construction donne après quelques jours des cristaux dans des conditions légèrement différentes de la première (0.1M BisTris pH5.5 ou 6.5, 2M Ammonium Sulfate). Bien que ces cristaux n'aient pas été testés pour diffraction, ils pourraient en revanche servir pour de futures études de **co-cristallisation** en raison de leur reproductibilité.

Figure 54 : la construction LgD₅₇₅₋₈₁₆ élue en filtration sur gel comme un monomère et cristallise dans des conditions sensiblement différentes de celles du fragment LgD₅₅₀₋₈₁₆.

- A. Elution de la construction sur colonne Ni-NTA à 250mM Imidazole.
- B. Profil d'élution sur colonne S200.
- C. Cristallisation de la construction en présence de 0.1M BisTris pH 6.5, 2M Ammonium Sulfate.
- D. Cristallisation de la construction en présence de 0.1M BisTris pH 5.5, 2M Ammonium Sulfate



En l'état, ayant pu obtenir la structure du fragment à partir du précédent jeu de cristaux, la résolution de ce fragment-ci n'apporterait que peu d'informations nouvelles **en l'absence de ligands** (type monophosphoinositides) ; elle n'a donc pas été poursuivie. Par ailleurs, puisque l'état monomérique de cette construction a été confirmé en solution, la mise en évidence de nouvelles interfaces de cristallisation serait superflue, car probablement induite par les conditions de cristallisation.

5.2 Purification et cristallisation de LgD₄₉₁₋₈₁₆

J'ai ensuite porté mes efforts sur le fragment LgD₄₉₁₋₈₁₆ qui comprend en particulier **la quatrième répétition DM14**, déjà impliquée dans une interaction avec la protéine kinase PDK1 (Nakamura et al., 2008). Cette construction est également bien exprimée, et purifiée selon un protocole identique aux deux précédents fragments. Après concentration de l'échantillon à 5mg/mL, le robot de cristallisation haut-débit du PSB donne plusieurs conditions prometteuses à 4°C. Les cristaux les mieux définis concernent les conditions décrites dans la **figure 55**. Parmi elles, la condition 0.2M Ammonium Phosphate, 0.1M Tris pH 8.5, 50% MPD a pu être reproduite manuellement. Cette condition donne principalement **des sphérulites**, soit des structures semi-cristallines, présentant en leur sein des régions amorphes. Ces structures ne sont donc pas en tant que telles des cristaux, et elles ne sont pas suffisamment ordonnées pour permettre de résoudre la structure du fragment. J'ai essayé d'améliorer ces sphérulites en les reproduisant en présence

de plusieurs additifs, mais sans succès. Ces sphérulites ont également été reproduits à 20°C mais je n'ai jamais pu produire de structure cristalline à partir de ces conditions.

Les conditions comprenant du NaH_2PO_4 et du K_2HPO_4 ont chacune donné des cristaux similaires en morphologie avec le robot, qui n'ont pas été reproduites manuellement. Les raisons de cet échec sont en revanche difficiles à interpréter. Il se peut qu'une concentration critique de l'échantillon n'ait pas été atteinte pour les nouveaux essais, et/ou que la température joue un rôle important dans le processus de cristallisation. Il est enfin possible que les conditions de pH et de sel définies fixées par le robot ne soient pas optimales, et que de nouveaux essais soient nécessaires afin d'optimiser ces conditions. En l'état, ces données suggèrent cependant que le fragment $\text{LgD}_{491-816}$ est **bien structuré en solution**, et qu'il est un bon

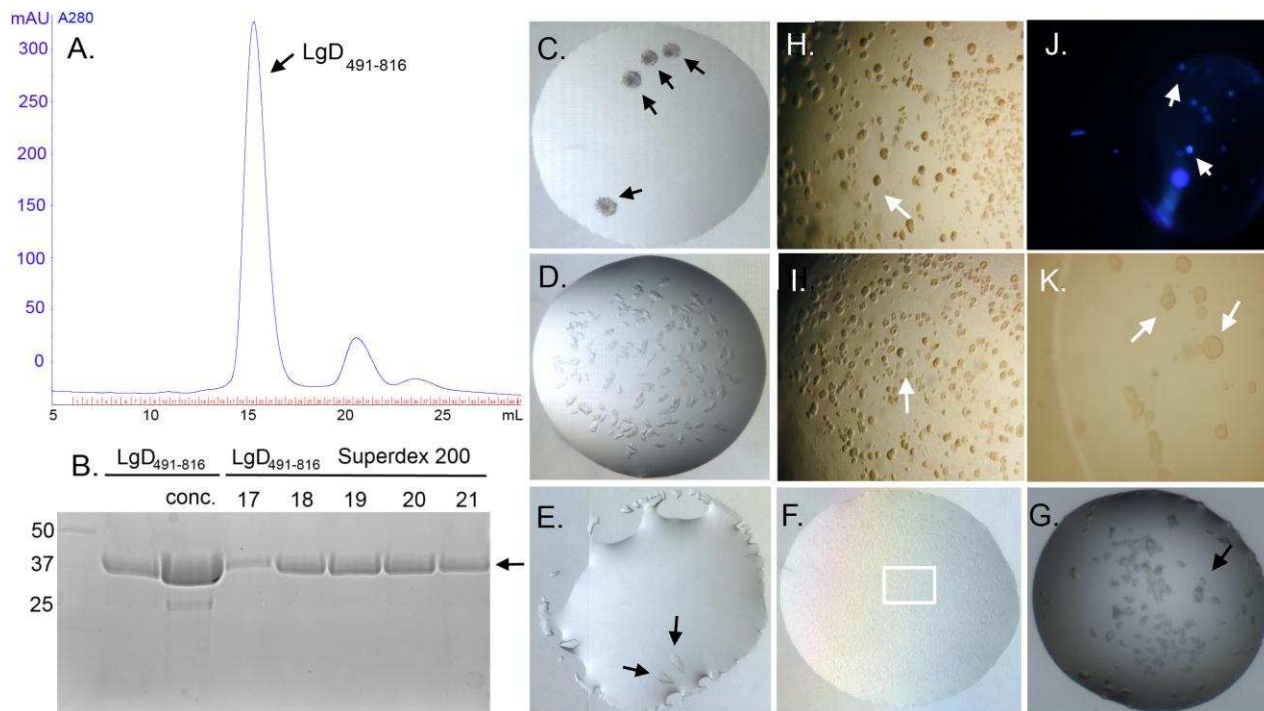


Figure 55: la préparation $\text{LgD}_{491-816}$ est monodisperse et cristallise sous plusieurs conditions différentes.

- A. Profil d'élution du fragment sur colonne de filtration sur gel Superdex 200.
- B. Echantillon correspondant chargé sur gel SDS-PAGE. Coloration au bleu de Coomassie.
- C-E. Cristaux obtenus par le robot à 4°C ; tous les cristaux indiqués apparaissent dans un délai de 3 jours à 1 semaine.**
 - C. 0.2M Ammonium Phosphate, 0.1M Tris pH 8.5, 50% MPD
 - D. 1.2M NaH_2PO_4 , 0.8M K_2HPO_4 , 0.1M CAPS pH 10.5, 0.2M Li_2SO_4 .
 - E. 0.8M NaH_2PO_4 , 1.2M K_2HPO_4 , 0.1M Acetate pH 4.5
 - F. 1M Sodium Citrate, 0.1M Imidazole pH 8
 - G. 0.2M Ammonium Phosphate, 0.1M Tris pH 8.5, 50% MPD (**condition identique à C. mais à 20°C**)
- H. Cristaux/sphérulites reproduits à 4°C avec 0.1M Tris pH8.5, 0.2M Ammonium Phosphate, 36-50% MPD
- I. Conditions identiques.
- J. Les cristaux/sphérulites émettent un fort signal sous lampe UV, ce qui témoigne de la présence de protéine (émission liée principalement aux tryptophanes et tyrosines).
- K. D. Agrandissement de sphérulites après 1 semaine dans les mêmes conditions.

candidat pour une étude par SAXS.

5.3 Purification du fragment LgD₃₅₈₋₈₁₆ et optimisation du protocole.

Le troisième fragment a été cloné pour inclure la région minimale prédite pour interagir avec CHMP4B chez l'humain. La première étude (voir chapitre précédent) avait mis en évidence un rôle particulier de la troisième répétition DM14 dans cette interaction. Les études par ITC avaient cependant noté que la troncature d'une région en aval de cette répétition entraînaient une perte de l'interaction. Cette donnée suggère que les répétitions DM14, telles que définies par bioinformatique, **ne correspondent pas directement à des domaines structuraux**. Un second argument en faveur de cette hypothèse est que, pour la plupart des membres de la famille CC2D1, on retrouve ces répétitions **en tandem**. Enfin, un papier montre que, chez l'homme et la souris, **deux isoformes différents sont produits à partir du gène CC2D1A** : un isoforme long et un isoforme court, ne comprenant que les deux dernières répétitions DM14 ainsi que le fragment C-terminal (Rogaeva & Albert, 2007). LgD sous sa forme longue étant peu exprimé chez E.Coli, j'ai supposé qu'une forme proche de l'isoforme court identifié chez l'homme permettrait des rendements supérieurs en système bactérien compatibles avec des tests de cristallisation.

Sous cette forme l'échantillon est produit en bonnes quantités, soit une vingtaine de mg de protéines pour trois litres de culture induits à 18°C sur la nuit, ou encore 3h à 37°C. (voir figure 56)

Le protocole de purification initialement établi est semblable aux autres fragments, avec une première purification sur colonne Ni-NTA (élution à 50 et 250 mM imidazole), puis clivage par la TEV, dialyse dans un **tampon 50 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl** en présence d'agent réducteur, et enfin une seconde étape de purification sur colonne Ni-NTA pour séparer le fragment clivé du non-clivé. L'échantillon est enfin concentré puis chargé sur colonne S200 (**voir figure 56**) où la protéine élue en un pic unique et symétrique. L'échantillon est purifié dans un tampon classique 20mM Tris pH 6.5, 100 mM NaCl, 5mM β -mercaptoéthanol ; sur les premières préparations, j'ai en revanche noté la coélution de bandes surnuméraires pouvant laisser penser à une légère dégradation ou contamination de la protéine. Afin d'obtenir une préparation homogène en vue d'études par cristallographie et/ou SAXS, j'ai procédé à une étape supplémentaire de purification sur colonne MonoS (ou colonne échangeuse de cations), selon un gradient de sel allant de 100 à 1M NaCl à partir du même tampon Tris. Un pic correspondant à la protéine d'intérêt élue pendant le gradient à environ 400 mM NaCl, puis est laissé sur deux jours en chambre froide. Cet échantillon présente, par rapport à la condition de stockage initiale à 100 mM NaCl, **une forte dégradation** avec l'apparition de deux bandes majeures à environ 40 kDa et 28 kDa, soit les tailles approximatives des fragments LgD₄₉₁₋₈₁₆ et LgD₅₇₅₋₈₁₆ respectivement.

Il est donc probable que les premières conditions de stockage définies pour la purification ne soient pas optimales, ce qui explique la dégradation rapide de l'échantillon, **en particulier en présence de fortes concentrations en sel**.

Afin d'optimiser les conditions de purification, et donc la stabilité du fragment, j'ai essayé de déterminer une composition optimale du tampon de stockage par la technique dite du « thermal shift assay ». Cette technique se base sur l'évolution de la stabilité thermique d'un échantillon, ainsi que les propriétés physico-chimiques du fluorophore Sypro. Dans un environnement aqueux, la fluorescence du Sypro est quenchée ; lorsque la protéine d'intérêt est dénaturée par augmentation de la température, les régions hydrophobes deviennent accessibles et vont réagir avec Sypro. La fluorescence de la sonde est alors déquenchée et le suivi peut être réalisé sur un lecteur de microplaques standard : cette méthode a le triple intérêt d'être **facile à mettre à place, rapide à analyser** et **adaptée pour une étude haut-débit**. Les conditions où la protéine est la plus stable sont déterminées par le calcul du T_m , au moment de la dénaturation.

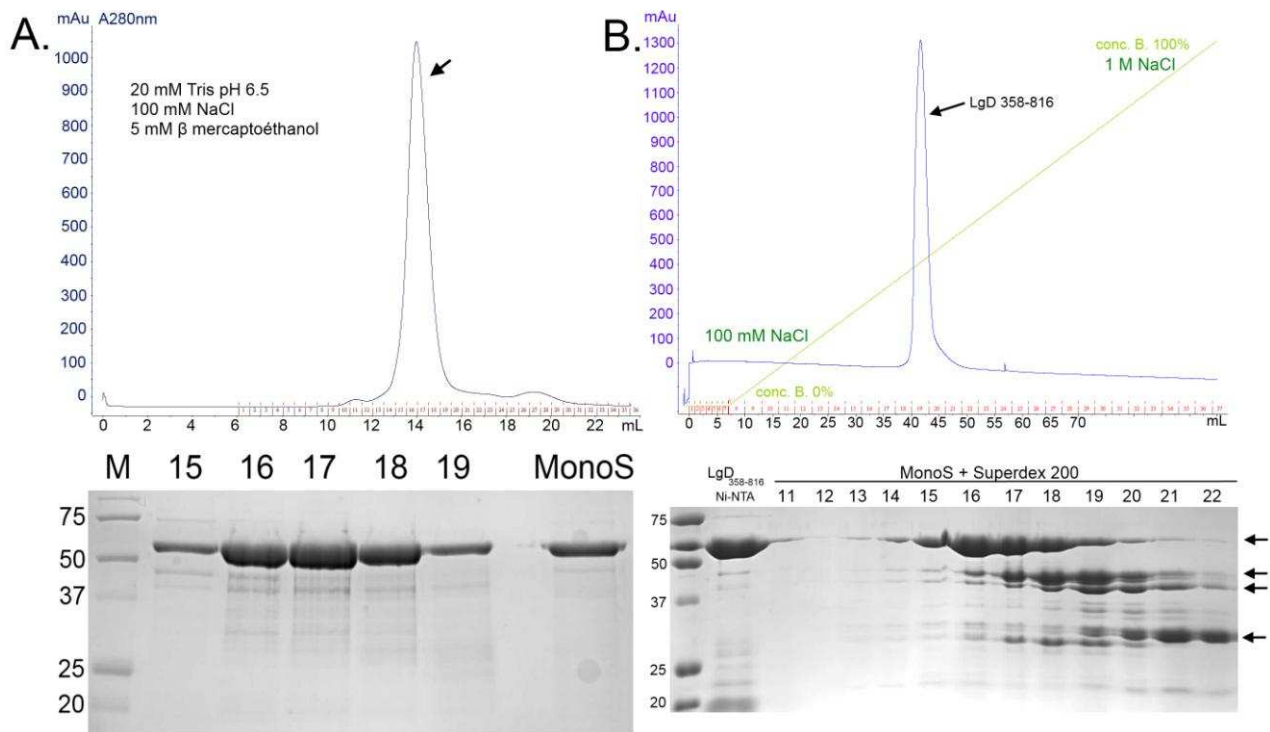


Figure 56 : LgD₃₅₈₋₈₁₆ est monomérique après filtration sur gel. La protéine est sensible à la protéolyse et se dégrade en présence de sel dans les conditions testées.

A. Le fragment est filtré sur S200 après une étape de purification sur résine Ni-NTA puis clivage à la protéase TEV. Les échantillons sont chargés en gel SDS-PAGE et montrent la présence de bandes contaminantes. L'échantillon marqué « MonoS » est chargé sur la colonne MonoS pour une seconde étape de purification.

B. Pendant l'étape de purification sur colonne MonoS, la protéine éluée massivement à pH 6.5 pour une concentration saline d'environ 400 mM NaCl. Après deux jours de stockage, les fractions composant le pic sont chargées sur colonne S200. Le gel SDS-PAGE met en évidence plusieurs fragments de protéolyse. Pour référence l'échantillon LgD en sortie de colonne Ni-NTA est chargé immédiatement à droite du marqueur.

Ici, j'étudie plusieurs tampons sous deux forces ioniques différentes ; en présence de 100mM NaCl ou 500 mM NaCl ; globalement j'observe des différences de stabilité importantes selon les tampons utilisés. Les tampons « riches » en sel (500mM NaCl) déstabilisent globalement la protéine par rapport à ceux avec 100 mM NaCl seulement. Les tampons les plus favorables se situent dans un intervalle de pH entre 6.0 et 6.5, selon les conditions. Les tampons Potassium Phosphate et Citrate de Sodium augmentent le Tm de la construction à 51 et 52°C respectivement. Par comparaison, les deux tampons les moins favorables sont les tampons Imidazole pH 8 et Bicine pH 9, à respectivement 44 et 40°C. J'ai donc opté, pour les études par SAXS, pour un tampon 25mM Sodium Citrate pH 6, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol pour cette dernière construction.

Un essai de cristallisation avec le robot haut-débit avait été tenté **sur les premières conditions de stockage**, à 20°C, en présence de 25mM Tris pH 7.6, 100mM NaCl, 5mM β-mercaptoéthanol. Cet essai avait permis de mettre en évidence plusieurs précipitats prometteurs. En particulier, une condition **1.17M NaH₂PO₄, 0.63M K₂HPO₄ pH 6.3** a été reproduite manuellement et donne après deux jours un précipité cristallin, mais pas de cristal individualisé. Une autre condition obtenue par le robot montre également l'apparition de sphérulites après 3 jours (**50mM MES pH 6, 5mM MgSO₄, 5% PEG4000**). Cette condition a été reproduite en évidence et montre après 2 jours l'apparition de structures gélatineuses. Enfin, une autre condition (**0.1M NaH₂PO₄ / 0.1M KH₂PO₄, 0.1 MES pH 6.5, 2M NaCl**) présente après 1 jour une séparation de phase, tandis que le reste de la goutte reste clair. La séparation de phase évolue après deux jours en sphérulite.

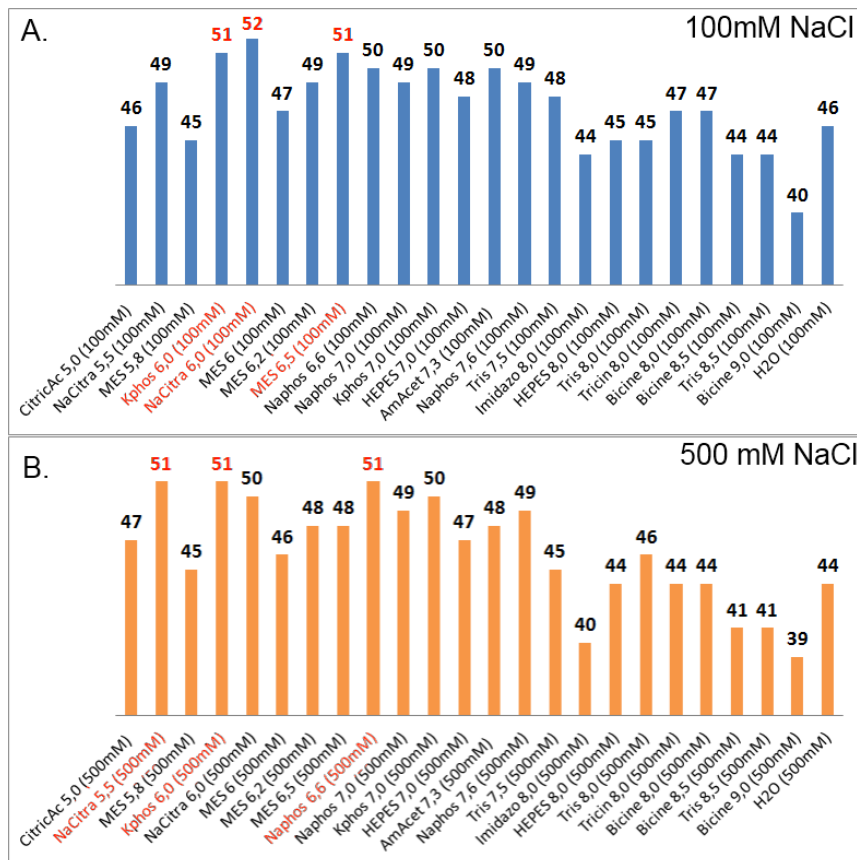


Figure 57 : Mesure de la température de dénaturation (ou Tm) par Thermoshift Assay du fragment LgD₃₅₈₋₈₁₆ en fonction de la concentration en sel, du pH, et de la composition du tampon.

A. Evolution du Tm en présence de 100 mM NaCl. Le tampon Sodim Citrate pH 6 est le meilleur parmi les conditions testées.

B. En présence de 500 mM NaCl le Tm diminue pour la plupart des conditions. Le tampon Citrate de Sodium pH 6 présente ici un Tm de 50.

Il serait donc intéressant de revoir puis d'affiner ces conditions, en particulier par microseeding, avec une préparation réalisée dans le **nouveau** tampon et à des concentrations **plus élevées**. En l'état ces résultats sont donc **prometteurs**, mais les conditions nécessitent d'être affinées afin d'obtenir de vrais cristaux individualisés.

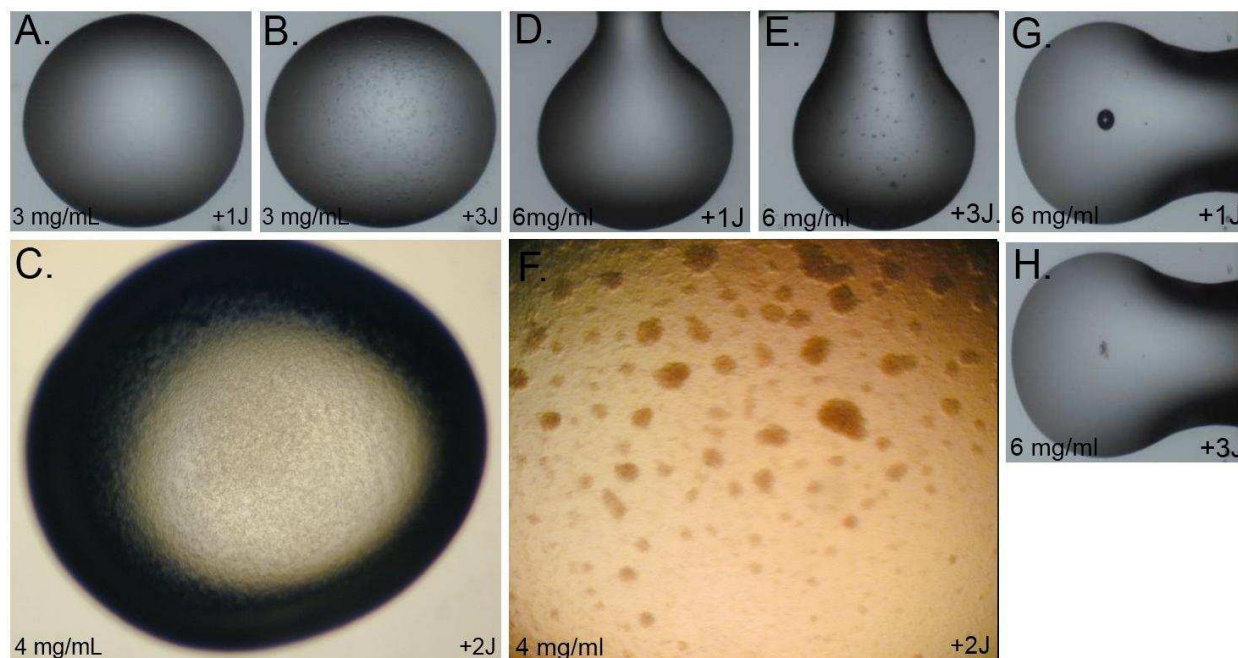


Figure 58 : conditions potentielle identifiées sur le fragment LgD₃₅₈₋₈₁₆ par le robot de cristallisation.

- A.** Goutte claire après 1J dans la condition **1.17M NaH₂PO₄, 0.63M K₂HPO₄ pH 6.3**.
- B.** **Microcristaux** mis en évidence après 3J dans la même condition.
- C.** Précipitat **pseudo-cristallin** reproduit manuellement après 2J.
- D-E.** **Sphérulites ou gels** produits après 3 jours dans la condition **50mM MES pH 6, 5mM MgSO₄, 5% PEG4000**
- F.** Condition reproduite manuellement après deux jours.
- G-H.** Possible **sphérulite** identifié après 3 jours (**0.1M NaH₂PO₄ / 0.1M KH₂PO₄, 0.1 MES pH 6.5, 2M NaCl**)

6. Un modèle partiel de LgD en solution

6.1 Modèle SAXS du fragment cristallisé LgD₅₇₅₋₈₁₆

Un premier échantillon du fragment LgD₅₇₅₋₈₁₆ est purifié comme indiqué dans le chapitre 5.1 puis concentré à 0.7, 0.9 et 1.8 mg/mL. Trois courbes de diffractions sont collectées sur la ligne dédiée ID14-3, puis soustraites à la courbe de diffraction obtenue à partir du tampon seul. Les intensités sont normalisées à partir des données extraites d'une solution de BSA de concentration connue. Les courbes de diffraction de chaque courbe, ainsi que les analyses de Guinier et la fonction de distribution P(r) sont traitées par la suite logicielle PRIMUS (Pethoukov et al., 2007) et présentées dans la figure 60.

L'analyse de Guinier (**figure 60b**) permet de mettre en évidence une relation linéaire entre le logarithme de l'intensité $\log I(S)$, ou $\log I(q^2)$ et la valeur de S^2 : cette linéarité renseigne sur la présence d'aggrégats dans l'échantillon. L'analyse de Guinier permet en outre de calculer le rayon de giration, ou Rg. Cette valeur doit rester sensiblement constante pour des valeurs croissantes de concentration, afin de vérifier l'absence non seulement l'absence de d'aggrégation de l'échantillon mais également l'absence d'oligomérisation concentration-dépendante. Ici, les valeurs de Rg restent comprises entre 2.63 et 2.76 nm, telles que déterminées par le logiciel AutoRg (Pethoukov et al., 2007), soit une valeur en accord avec les données cristallographiques pour un fragment monomérique.

La fonction de distribution P(r) donne une information sur la forme de la protéine, et permet entre autres de déterminer la valeur Dmax, soit la valeur de r telle que P(r)=0. Elle représente la distance intramoléculaire maximale en solution. Pour une taille donnée, cette valeur sera donc d'autant plus importante que la protéine est allongée. En outre, l'aspect de la fonction de distribution peut renseigner sur la présence de plusieurs domaines au sein du fragment. Dans le cas du fragment LgD₅₇₅₋₈₁₆, la valeur Dmax calculée est de 9.7 nm pour une concentration de 1.7 mg/ml.

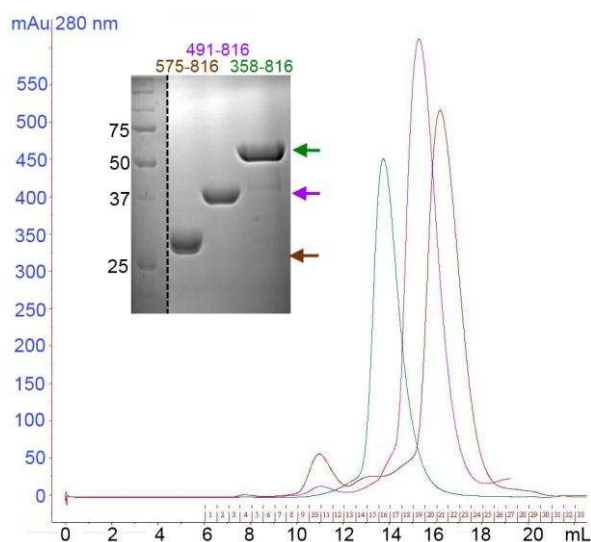


Figure 59 : Profil d'élution des trois constructions utilisées pour les mesures SAXS.

Les profils d'élution des trois protéines sont suivis par la mesure d'absorbance à 280 nm, sur une colonne S200. Les volumes d'élution des constructions LgD₅₇₅₋₈₁₆, LgD₄₉₁₋₈₁₆ et LgD₃₅₈₋₈₁₆ sont respectivement de 16.5, 15.5 et 14 mL, ce qui suggère une forme allongée en solution de cette dernière.

Les fragments LgD₅₇₅₋₈₁₆, et LgD₄₉₁₋₈₁₆ sont purifiés dans un tampon 25 mM Tris pH 7, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol. Le fragment LgD₃₅₈₋₈₁₆ est purifié dans le tampon 25 mM Sodium Citrate pH 6.5, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoéthanol.

La forme de la fonction de distribution suggère la présence de deux domaines, toujours en accord avec la structure cristallographique. Dix reconstructions indépendantes sont générées par le logiciel DAMMIN (Svergun D., 1999) sans imposition de symétrie. La valeur de χ obtenue pour chaque modèle est d'environ 1.16, ce qui montre un accord satisfaisant entre les modèles générés et la courbe expérimentale.

Un modèle final de la protéine en solution est généré par les logiciels DAMAVER (Volkov, Svergun, 2003) et SUPCOMB 2.0 (Kozin, Svergun, 2000) : les dix modèles se superposent avec un NSD (Normalized Spatial Discrepancy) de 0.859, ce qui signifie qu'il y a donc convergence vers une solution unique. L'enveloppe obtenue est superposée avec le monomère cristallographique par le logiciel SUPCOMB ; visuellement la structure en solution est donc très proche de celle observée dans le cristal. On retrouve en particulier les deux régions distinctes formées par le domaine C2 et la partie hélicale. La stabilisation de cet arrangement par l'extrémité c-terminale est donc bien une propriété de la protéine et non pas un artefact cristallographique.

Afin de déterminer si la structure cristallographique du fragment LgD₅₇₅₋₈₁₆ correspond bien à la structure en solution, j'ai également comparé les courbes SAXS théoriques et expérimentales par le logiciel CRY SOL (Svergun, Barberato, Koch, 1995). En revanche, la courbe théorique (figure 60a) présente une déviation notable ($\chi = 1.5$) par rapport à la courbe expérimentale. Cette donnée suggère donc une certaine flexibilité entre la partie hélicale et le domaine C2 en solution, ou encore entre les boucles flexibles du domaine C2 lui-même.

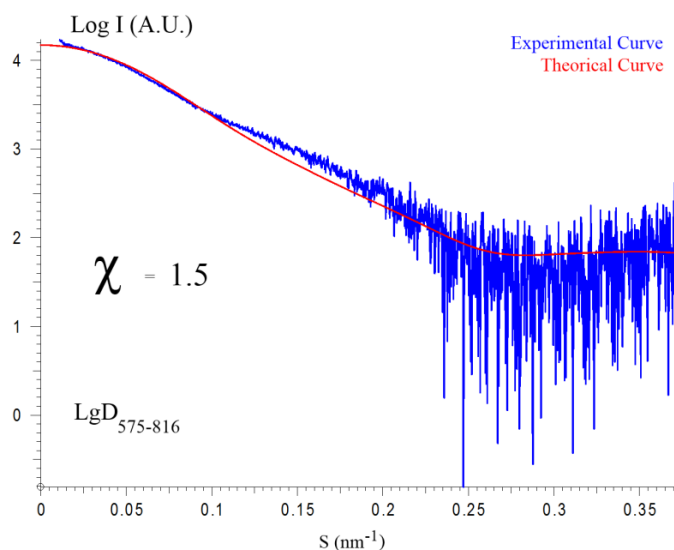


Figure 60a. Comparaison des profils théoriques et expérimentaux par SAXS du fragment c-terminal de LgD.

La courbe théorique SAXS du fragment cristallographique LgD₅₅₀₋₈₁₆ est générée automatiquement par le logiciel CRY SOL, puis comparée à la courbe expérimentale du fragment LgD₅₇₅₋₈₁₆.

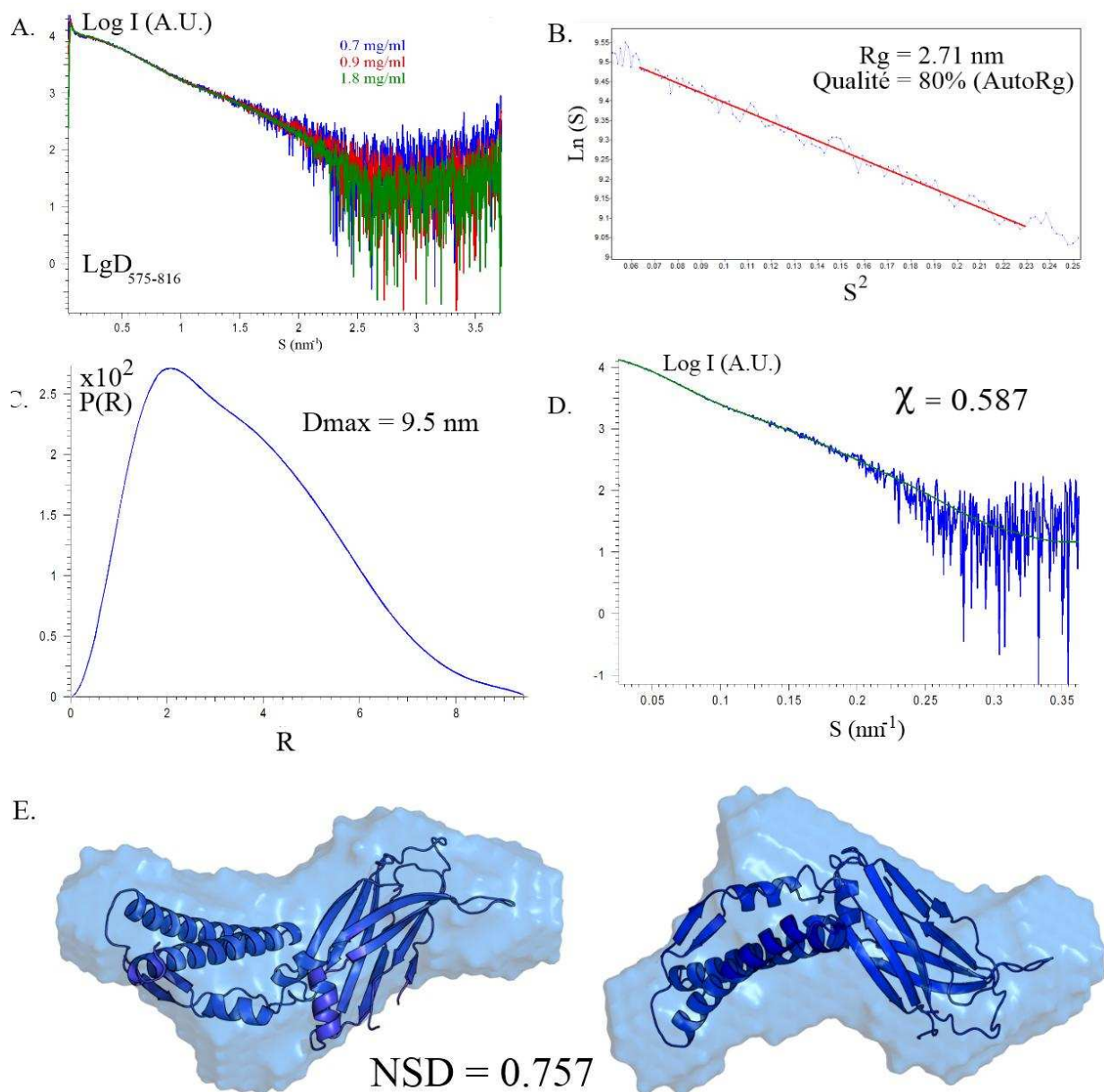


Figure 60b. Traitement des données SAXS à partir du fragment LgD₅₇₅₋₈₁₆.

- Superposition de courbes de diffractions de LgD₅₇₅₋₈₁₆ à trois concentrations différentes.
- Courbe de Guinier établie par AutoRG sur la courbe du fragment à 0.9 mg/mL.
- Fonction de distribution à partir du même jeu de données, et estimation de la valeur Dmax.
- Corrélation entre les données brutes (à 0.9 mg/ml) et la courbe théorique de diffusion d'un modèle représentatif généré par DAMMIN.
- Superposition de dix modèles DAMMIN par les logiciels DAMAVER 2.0 et SUPCOMB. La structure du monomère LgD₅₇₅₋₈₁₆ est placée automatiquement dans cette enveloppe moyenne (NSD= 0.859) par le logiciel SUPCOMB et montre visuellement une bonne corrélation.

6.2 Modèle SAXS des fragment LgD₄₉₁₋₈₁₆ et LgD₃₅₈₋₈₁₆

Les données SAXS issues du fragment LgD₄₉₁₋₈₁₆ sont traitées d'une façon identique. Ce fragment intermédiaire comprend donc 84 résidus supplémentaires par rapport au premier, et comprend donc la quatrième répétition DM14. Quatre courbes de diffusion sont collectées avec des préparations de 1, 1.8, 2.4, et 3.7 mg/ml. Les valeurs de R_g récoltées ne varient pas significativement dans cet intervalle (3.19 – 3.48 nm) comme le montre l'analyse de Guinier par le logiciel AutoRg. Une fonction de distribution est calculée à partir de l'échantillon à 2.4 mg/ml avec un D_{max} évalué à 11.8 nm. Le modèle moyen généré par DAMAVER (NSD = 1.129) montre des similitudes avec le précédent modèle, généré par le fragment court. On met cependant en évidence, au niveau d'une des extrémités, la présence d'un domaine plus marqué qui est vraisemblablement attribuable à la quatrième répétition DM14.

J'ai réalisé un troisième modèle SAXS à partir du fragment étendu LgD₃₅₈₋₈₁₆ qui comprend la région identifiée chez CC2D1A comme interagissant avec CHMP4B. Trois concentrations sont testées, à 2.7, 4.3 et 5.4 mg/ml. Les valeurs de R_g ne varient pas significativement dans cet intervalle (3.92-4.47 nm). La valeur de D_{max} calculée pour la concentration à 4.3 mg/ml est de 16.9 nm. Le volume généré par DAMAVER met en évidence, à une extrémité, une forme retrouvée dans la précédente reconstruction et attribuable au domaine C2.

En superposant les trois volumes obtenus (**voir figure 63**), on peut donc fixer une des extrémités manuellement et positionner approximativement les régions non présentes dans la structure cristallographique. Les deux répétitions DM14 apparaissent globalement étendues mais structurées, et semblent se replier partiellement l'une sur l'autre. Ces volumes font immédiatement suite à la partie hélicale, ce qui suggère donc que cette dernière soit impliquée dans la stabilité des motifs. D'après ce modèle, la surface concave du domaine C2 est bien **individualisée** du reste de la structure, ce qui va dans le sens d'un rôle de ce dernier dans des interactions protéine-protéine et/ou protéine-membrane.

On observe sur les trois modèles une protrusion au niveau d'une des extrémités, attribuable à la région hélicale marquant la transition entre le domaine C2 et la quatrième répétition DM14 : en l'état, il n'est pas possible de conclure sur la structure **précise** de chaque domaine, les modèles obtenus étant à faible résolution, ce qui est une limite intrinsèque de la technique employée.

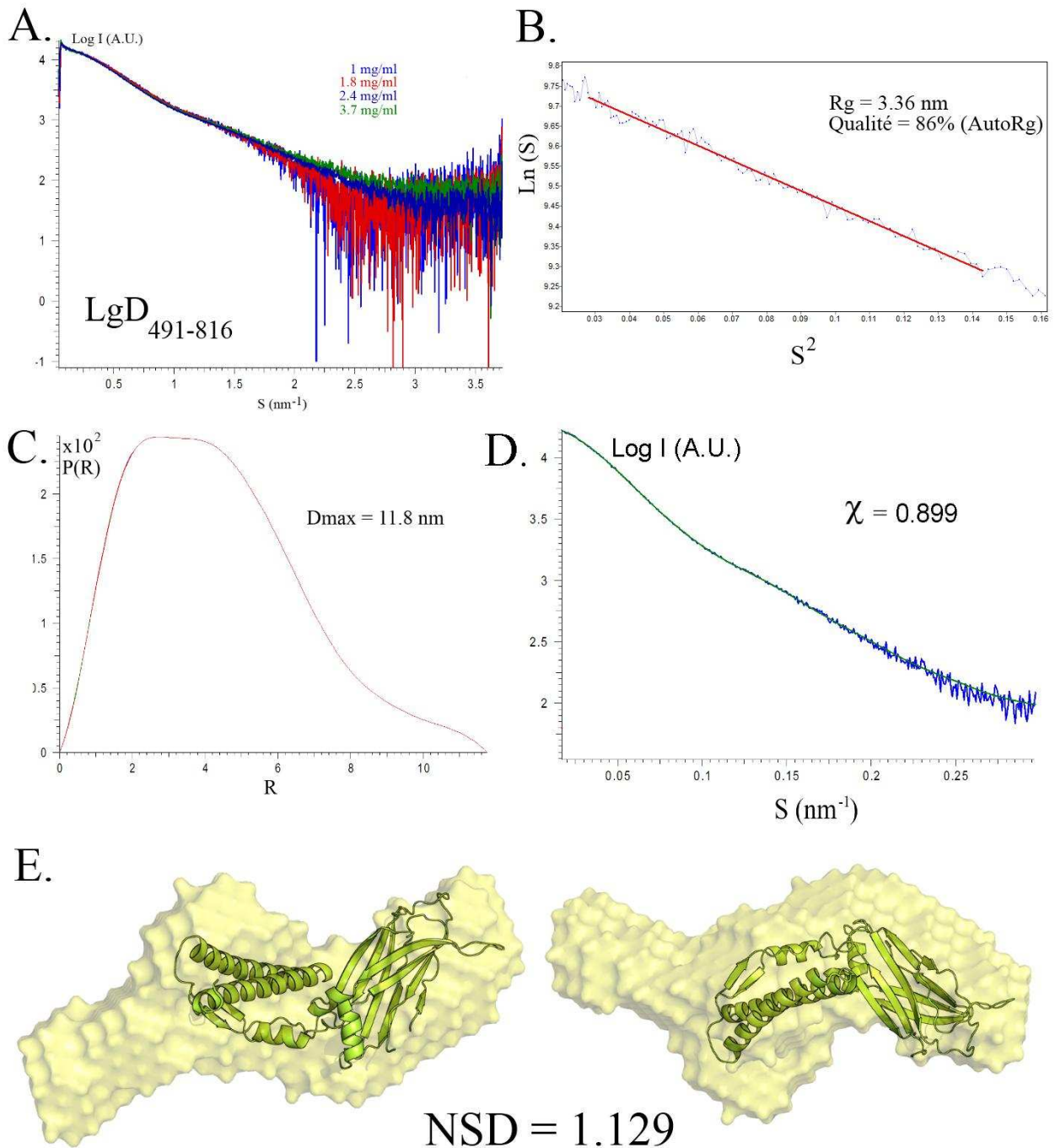


Figure 61. Traitement des données SAXS à partir du fragment LgD₄₉₁₋₈₁₆

- A. Superposition de courbes de diffractions de LgD₄₉₁₋₈₁₆ à trois concentrations différentes.
- B. Courbe de Guinier établie par AutoRg sur la courbe du fragment à 2.4 mg/mL.
- C. Fonction de distribution à partir du même jeu de données, et estimation de la valeur D_{max}.
- D. Corrélation entre les données brutes à 2.4 mg/ml et la courbe théorique de diffraction d'un modèle représentatif généré par DAMMIN.
- E. Superposition de dix modèles DAMMIN par les logiciels DAMAVER 2.0 et SUPCOMB. La structure du monomère LgD₅₇₅₋₈₁₆ est placée manuellement dans cette enveloppe moyenne (NSD= 1.129).

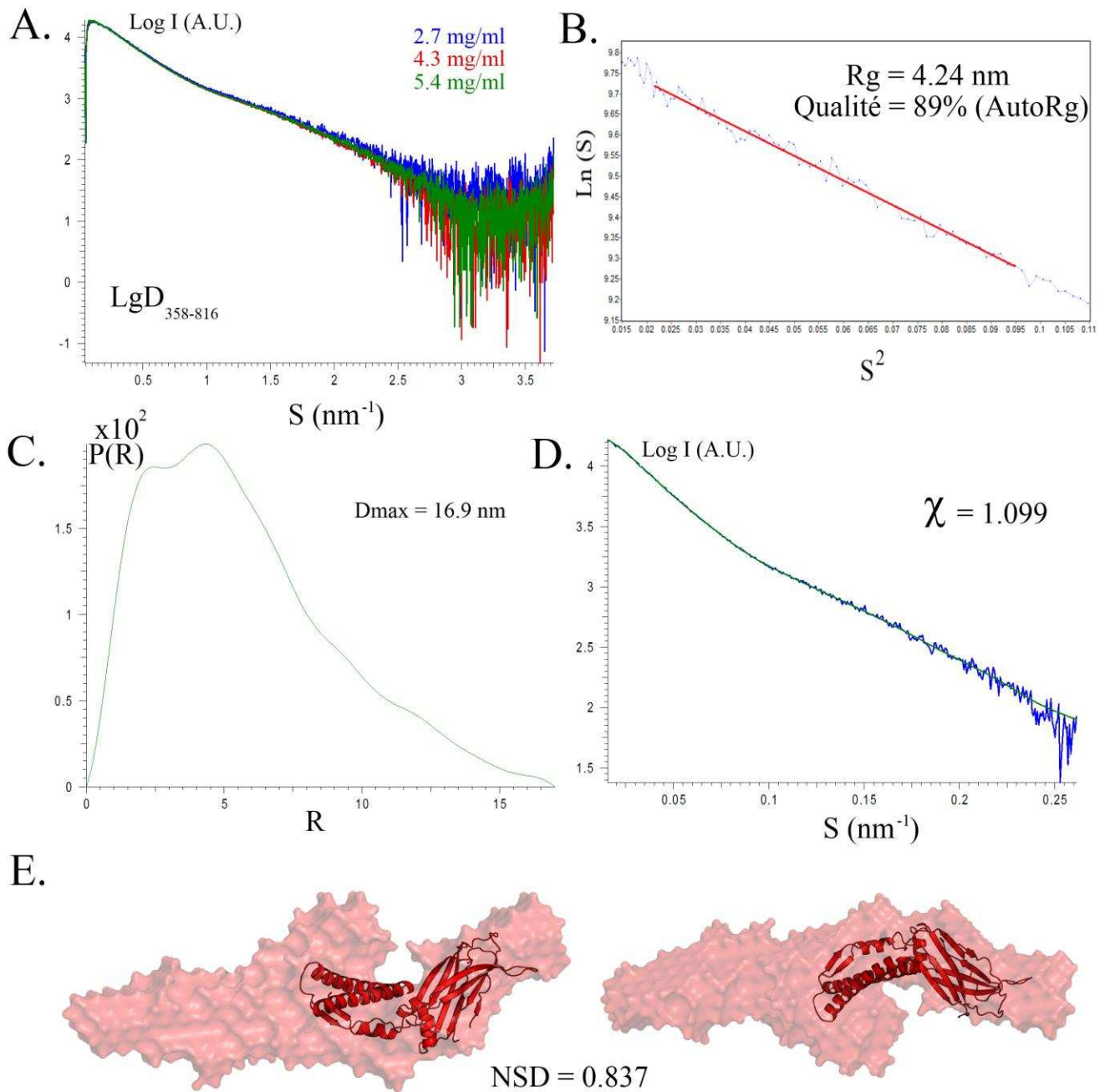


Figure 62. Traitement des données SAXS à partir du fragment LgD₄₉₁₋₈₁₆

- Superposition de courbes de diffractions de LgD₃₅₈₋₈₁₆ à trois concentrations différentes.
- Courbe de Guinier établie par AutoRg sur la courbe du fragment à 4.3 mg/mL.
- Fonction de distribution à partir du même jeu de données, et estimation de la valeur D_{max} .
- Corrélation entre les données brutes à 4.3 mg/ml et la courbe théorique de diffraction d'un modèle représentatif généré par DAMMIN.
- Superposition de dix modèles DAMMIN par les logiciels DAMAVER 2.0 et SUPCOMB. La structure du monomère LgD₅₇₅₋₈₁₆ est placée manuellement dans cette enveloppe moyenne (NSD= 0.837).

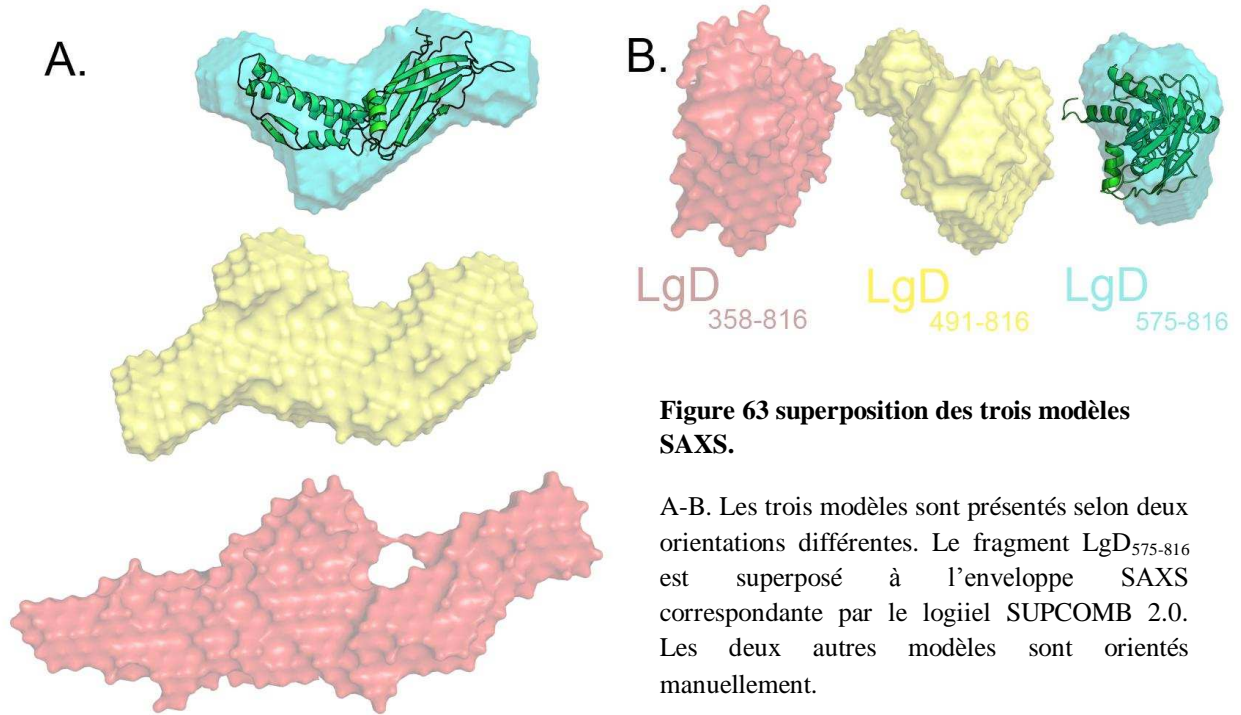


Figure 63 superposition des trois modèles SAXS.

A-B. Les trois modèles sont présentés selon deux orientations différentes. Le fragment LgD₅₇₅₋₈₁₆ est superposé à l'enveloppe SAXS correspondante par le logiciel SUPCOMB 2.0. Les deux autres modèles sont orientés manuellement.

7. Discussion

7.1 Description générale du fragment LgD et contexte de l'étude

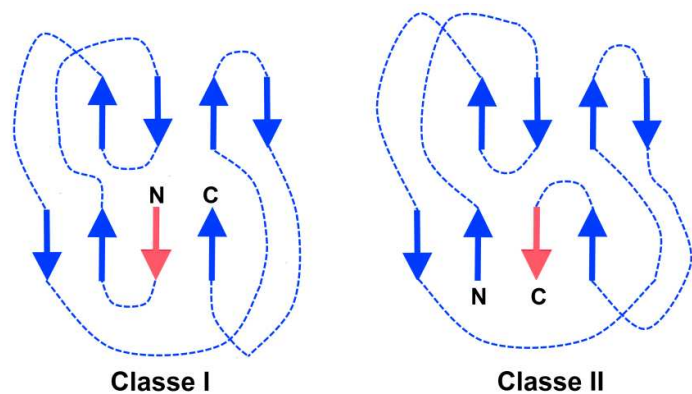
Le fragment LgD qui a été cristallisé présente une région impliquée à la fois dans la régulation transcriptionnelle (Ou et al., 2003) et la régulation du récepteur Notch (Childress et al., 2006 ; Gallagher et al., 2006 ; Knoblich et al., 2006). La partie C-terminale de la structure, représentée par le fragment **796-816**, participe en outre à la stabilisation de la région hélicale contre la face convexe du domaine C2. La conservation des résidus impliqués dans l'orientation de cette région permettent donc la bonne accessibilité de la partie concave du domaine C2, ainsi que la rigidité de la structure : cette orientation est donc vraisemblablement importante pour la fonction de LgD.

Les résidus **580 à 637** composent un faisceau d'hélices, dont la fonction pourrait être la régulation transcriptionnelle du gène codant pour le récepteur à la sérotonine (Ou et al., 2003). Ces auteurs avaient en particulier proposé qu'un motif HLH prédit dans la structure de CC2D1A puisse être impliqué dans une interaction avec l'ADN. La structure confirme la présence d'un motif hélice-boucle-hélice, en revanche ses propriétés d'interaction avec des acides nucléiques n'ont pas été testées dans cette étude. Par ailleurs, les motifs de type HLH ou bHLH interagissant avec l'ADN sont connus pour former des homo- ou hétérodimères (Murre et al., 1989 ; Ferré-D'Amaré, 1994 ; Toledo-Ortiz G, 2003). Or le fragment identifié ici se comporte en solution comme un monomère strict et ne correspond pas à la définition d'un domaine bHLH.

Les domaines C2 peuvent adopter deux topologies différentes (type I et type II) (Nalefski & Falke, 1996). Ici, le domaine C2 de LgD appartient à la catégorie des domaines de topologie II. Il constitue un domaine C2 atypique, en ce sens qu'il présente également un site polybasique, ou polycationique, conservé entre espèces. En l'état, la présence de ce site sur la face concave du domaine est une propriété particulière de LgD, **et n'a à ma connaissance pas été rapportée pour des domaines C2 de seconde topologie (Guerrero-Valero et al., 2009)**. De même, aucun domaine C2 spécifique des monophosphoinositides n'a jusqu'à présent été décrit sur le plan structural.

Figure 64 : représentation schématique des deux topologies de domaine C2 (d'après Nalefski & Falke, 1996).

Les deux modèles présentent un arrangement similaire avec la formation de huit feuillettes β antiparallèles. La différence majeure entre les deux repliements concerne le décalage des extrémités N-terminales.



Les précédents auteurs avaient noté l'absence de cinq résidus Aspartate (Zhao et al., 2010) habituellement impliqués dans la coordination de deux ions Calcium pour les domaines C2 Ca^{2+} dépendants (Sutton, 1995 ; Shao et al., 1996). Ce type de coordination a été identifié à partir des domaines C2 de la Synaptotagmine, puis étendu à plusieurs autres domaines de type I (Nalefski & Falke, 1996).

A partir de l'alignement de séquence, et en considérant la différence de topologie, je ne retrouve qu'un seul de ces Aspartates. Cette information suggère que le domaine C2 de LgD n'est pas Ca^{2+} dépendant. Je note toutefois la présence d'une insertion particulière (« **KDVDT** ») propre à LgD, et strictement conservée, qui pourrait se substituer à certains des résidus manquants. En superposant ce domaine avec celui de la PKC α , les trois résidus Aspartate identifiés chez LgD sont en outre impliqués dans la formation de deux poches superposables avec celles coordonnant le calcium pour les domaines Ca^{2+} dépendants (Guerrero-Valero et al., 2009). Il semble donc que LgD contienne potentiellement un site de coordination atypique du Calcium, indépendant du site polycationique décrit précédemment, qui ait pu passer jusque là inaperçu en raison des différences de topologie.

7.2 Interaction du domaine C2 avec la membrane de l'endosome

La structure du fragment C-terminal de LgD a donc permis de mettre en évidence **un domaine C2 atypique**, ainsi qu'une région jusque là non caractérisée de la protéine. La présence d'un site polybasique sur la face concave de la protéine est également cohérente avec les données de la littérature concernant l'interaction avec des phosphoinositides (Guerrero-Valero et al., 2009). A partir des techniques employées (ITC, tests de flottation), je n'ai en revanche pas été en mesure de mettre en évidence une interaction stable avec le PI4P. **Une possibilité est que cette affinité soit faible et/ou conditionnelle**. En effet, les paramètres pouvant influencer sur une interaction protéine-membrane sont variés (Lemmon, 2008) : ils peuvent être liés à la **composition** des membranes elles-mêmes, à leur **rayon de courbure** et/ou à la présence d'autres **partenaires** ; protéines, lipides ou cofacteurs.

Concernant le ligand, nous avons initialement choisi le PI4P car il semblait présenter en Dot Blot (voir figure 50C) le plus fort signal. Dans ce cas précis, il est possible que, dans des conditions plus physiologiques, le PI4P **ne soit pas le ligand principal** et qu'il constitue un faux positif avec cette technique. Bien que le signal obtenu pour le PtdIns(4)P soit marqué dans l'expérience de Gallagher (Gallagher et al., 2006), le PI3P pourrait être un candidat **plus physiologique** dans le contexte d'une **régulation de la voie endosomale**. Les phosphoinositides constituent en effet une population variée, mais dont la nature va dépendre de leur localisation. Le PtdIns(4,5)P est par exemple impliqué en tant que co-récepteur au niveau de la membrane plasmique, tandis que le PtdIns(4)P sera plus sélectivement présent au niveau de l'appareil de Golgi (Di Paolo G, De Camilli P, 2006). Le PtdIns(3)P est un marqueur des endosomes précoces, et une liste importante de protéines endosomales présentent elles-mêmes des modules reconnaissant spécifiquement ce phospholipide (Lemmon, 2004 ; Lemmon, 2008), en particulier les domaines FYVE et PH.

Les modules responsables de ces interactions peuvent également agir comme des « **détecteurs de coïncidence** », au sein de complexes comprenant plusieurs sites d'interaction de faible affinité (Di Paolo & De Camilli, 2006). Dans le contexte d'une interaction CC2D1A/CHMP4B stable, il faut rappeler que la protéine CHMP4B présente elle-même une affinité particulière pour le PtdIns(3)P (Lin et al., 2004). Il est

donc possible que ce soit l'action conjointe des deux molécules qui permette le recrutement du complexe au niveau de la membrane des endosomes précoces.

Par ailleurs l'affinité de la PKC α avec l'IP3 rapportée par Guerrero-Valero (Kd de 20 μ M), est bien inférieure à celle déterminée pour le PI(4,5)P₂ lui même (1.8 μ M) (Sanchez-Bautista, 2006) ; cette donnée suggère que d'autres déterminants favorisent cette interaction in vivo et que l'interaction spécifique à la tête polaire du PIP₂ est faible dans le cas de la PKC α . Dans le cas de LgD et d'une interaction avec des monophosphoinositides, **l'absence d'un phosphate** pourrait de fait produire une affinité encore moindre pour la tête polaire isolée. CHMP4B interagissant directement avec la membrane de l'endosome, il est encore possible qu'un complexe CC2D1A/CHMP4B ou LgD/Shrub présente une affinité accrue par un phénomène **d'avidité**. Dans ce cas précis, le domaine C2 aurait donc plus un rôle de **positionnement** au niveau de la membrane que de recrutement.

En particulier une étude a montré (Fyfe et al., 2011) récemment que l'affinité du complexe ESCRT-II/Vps20 pour des membranes de composition complexe (PC (54%), PE (30%), PS (15%) PI3P (1%)) était **proportionnelle au carré du rayon de courbure**. Dans la même étude, il a été proposé que ce soit ESCRT-II qui confère cette propriété à Vps20, conformément au modèle proposé par Im (Im et al., 2009) concernant la structure cristallographique du complexe Vps25/Vps20.

Dans ce contexte, je propose que CC2D1A/LgD, en interagissant avec CHMP4B, puisse induire un complexe ayant des propriétés physiques similaires par le biais de son domaine C2.

7.3 Homologies avec d'autres domaines C2 connus

Les domaines C2 présentent pour la plupart de fortes homologies de séquence et de structure (Nalefski & Falke, 1996). Il est donc difficile, **sur ce seul critère**, d'en prédire la topologie et/ou les caractéristiques physiques. La classification proposée par le serveur DALI répertorie les domaines C2 les plus proches en terme de structure. A l'exception du domaine C2 de l'Ortoferline, ces domaines présentent des propriétés d'interaction **avec des phosphoinositides**.

Le domaine C2 de LgD présente des similitudes importantes avec les domaines C2 des protéines NEDD4 et ITCHY (rmsds respectifs de 2.5 et 2.3Å). Cette similitude est troublante compte tenu du rôle de NEDD4 dans la voie de régulation du récepteur Notch. En particulier, la protéine NEDD4 est une **E3 Ubiquitine Ligase** impliquée dans l'activation ligand-indépendante du récepteur Notch (Sakata et al, 2004). Or, il a été montré in vivo (Klein et al., 2006) que NEDD4 supprimait l'activation de Notch chez des mutants lgd.

Par ailleurs un lien a été établi entre NEDD4, ITCH , et le bourgeonnement de certains virus enveloppés (Weiss & Gottlinger, 2011 ; Martin-Serrano & Neil, 2011 ; Jadwin et al., 2010). Concernant NEDD4, une étude récente (Sette et al., 2010) suggère également un recrutement par Alix dans le bourgeonnement du HIV.

Ces données vont donc dans le sens d'un rôle de LgD dans une ou plusieurs voies dépendantes de NEDD4 et ITCH.

7.4 Modèles SAXS de LgD

Les modèles SAXS associés ont en outre permis de mieux comprendre l'architecture de cette protéine. Le domaine C2 semble ici bien individualisé, ce qui valide d'une part la structure cristallographique et qui est d'autre part compatible avec son implication dans des interactions protéine/membrane et/ou protéine/protéine. Ces trois modèles SAXS suggèrent encore que les répétitions DM14 ne correspondent pas à des domaines individualisés. De fait, une stratégie basée sur des troncations individuelles de ces motifs (Nakamura et al., 2008 ; Zhao et al., 2010) ne semble pas ici adaptée car elle induit vraisemblablement une déstabilisation de la structure, et donc un impact sur sa fonction in vivo.

Bien que la protéine LgD/CC2D1A ait été décrite comme une protéine échaffaudage (Nakamura et al., 2008 ; Zhao et al., 2011), elle présente d'importants éléments de structure ; en l'état, la partie C-terminale semble jouer un rôle de stabilisation. Par ailleurs la distance entre la troisième répétition DM14 et le domaine C2 est évaluée à partir du modèle SAXS à environ 16 nm, ce qui situe le domaine d'interaction avec CHMP4B à distance du domaine C2. Bien que la troncature du fragment C-terminal entraîne un défaut dans l'internalisation du récepteur Notch (Childress et al., 2006), il est donc improbable que ce fragment soit lui-même **directement** impliqué dans l'interaction avec CHMP4B.

7.5 Perspectives.

De nouveaux essais de cristallisation sur les fragments C-terminaux de ces deux protéines sont donc parfaitement indiqués, compte tenu des résultats prometteurs obtenus jusque là avec le robot de cristallisation haut-débit. Bien que certaines des conditions mentionnées n'aient pas été reproduites manuellement, et/ou qu'elles n'aient pas donné de cristaux individualisés, l'obtention **à postériori** d'un fragment LgD₃₅₈₋₈₁₆ plus stable en solution (**et utilisé pour la présente étude en SAXS**) **justifierait pleinement la poursuite de ces essais de cristallisation**. L'obtention de la structure du fragment LgD₃₅₈₋₈₁₆ serait importante à plus d'un titre : outre l'obtention d'une structure haute-résolution des deux dernières répétitions DM14, elle permettrait également sur la base des données de pulldown de proposer un modèle du complexe CHMP4B/CC2D1A. CC2D1A prévenant partiellement la polymérisation de CHMP4B (voir chapitre précédent), ce modèle pourrait également nous renseigner sur les interfaces impliquées dans le polymère.

A l'avenir il serait intéressant de tester in vivo le rôle du site polybasique : entre autres, des mutations ciblées pourraient préciser le rôle du domaine C2 dans un contexte plus physiologique. **Un premier modèle d'étude** pourrait être lié au rôle de CC2D1A et LgD dans la division cellulaire, et en particulier au niveau des centrosomes et pendant l'étape d'abscission (Nakamura et al., 2009 ; Neumann et al., 2010).

Un second modèle d'étude pourrait également porter sur l'impact de CC2D1A ou LgD dans la régulation du récepteur Notch. Enfin, ces deux aspects étant eux-mêmes dépendants de la machinerie ESCRT, cette étude permettrait de préciser le rôle de cette dernière dans ces deux processus cellulaires.

CHAPITRE V – Caractérisation de la protéine CHMP2B in vitro.

Article 2 : Charged Multivesicular Body Protein-2B (CHMP2B) of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane

Gilles Bodon *, Romain Chassefeyre *, Karin Pernet-Gallay, Nicolas Martinelli, Grégory Effantin, David Lutje Hulsik, Agnès Belly, Yves Goldberg, Christine Chatellard-Causse, Béatrice Blot, Guy Schoehn, Winfried Weissenhorn et Rémy Sadoul.

* : les auteurs ont contribué également

Journal of Biological Chemistry, **Accepté**.

Contexte de l'étude : afin d'expliquer le mécanisme de scission, deux modèles ont été proposés. Un premier modèle (Lata et al., 2008 ; Fabrikant et al., 2009) suggère que les protéines CHMP2A et CHMP3 (Vps2 et Vps24 chez la levure) puissent former une structure en dôme capable d'être dissociée par VPS4. Dans ce modèle, ces trois protéines pourraient jouer un rôle actif dans le mécanisme de scission, en imposant des contraintes sur la membrane plasmique. Les données récentes sur le système ESCRT-III chez la levure suggèrent que Snf7 jouerait au contraire le rôle principal dans le mécanisme de scission membranaire, indépendamment de Vps2, Vps24 et Vps4 (Wollert et al., 2009 ; 2010). Ce second modèle est donc en partie contradictoire avec le premier.

Par ailleurs, CHMP2B a été directement impliquée dans une maladie neurodégénérative. Une hypothèse est que CHMP2B puisse perturber le mécanisme d'autophagie, sous certaines formes mutantes. En revanche, aucune structure en dôme équivalente aux polymères CHMP2B-CHMP3 n'a pu être mise en évidence in vitro ou in vivo, de même qu'un rôle de CHMP2A dans ces maladies neurodégénératives. Les fonctions de CHMP2B au sein d'ESCRT-III sont donc encore méconnues.

Résultats : Ce travail montre, pour la première fois, que CHMP2B est capable d'interagir et de stabiliser une structure tubulaire au niveau de la membrane plasmique. La surexpression de plusieurs constructions de CHMP2B entraîne l'apparition de tubulations à la surface des cellules HeLa et HEK, vers le milieu extracellulaire. Ce phénomène n'est en revanche pas observé lors de la surexpression de CHMP2A, 3, 4A, 4B et 4C : cette donnée supporte donc un rôle actif de CHMP2B dans le mécanisme. En outre, la surexpression d'un mutant CHMP2B incapable de lier VPS4 n'entraîne pas de tubulation, ce qui suggère également un rôle de VPS4 dans ce processus de remodelage. Ce travail s'apparente donc au travail de Hanson (Hanson et al., 2008), où des cellules COS-7 surexprimant CHMP4A et CHMP4B formaient des protrusions similaires, mais dont le contenu n'avait jusqu'alors pas été identifié.

Une hypothèse est donc que CHMP2B soit en partie impliqué dans le phénomène rapporté par Hanson, ce qui apporte du crédit au modèle où CHMP4 ne serait pas seul impliqué dans la scission ESCRT-III dépendante.

Contribution personnelle : la mise en place d'un protocole de purification de CHMP2B sous forme monomérique a permis d'identifier une interaction de cette dernière avec des liposomes. Cette interaction semble médiée par des lipides chargés négativement (type DOPS), et dépendante du sel. En revanche, il est possible d'inhiber cette interaction en mutant un motif « LF » à l'extrémité n-terminale, strictement conservé chez la plupart des protéines ESCRT-III. Cette donnée suggère donc que la partie n-terminale de CHMP2B, et potentiellement d'autres membres d'ESCRT-III, jouent un rôle important dans sa fonction de remodelage.

Charged Multivesicular Body Protein-2B (CHMP2B) of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport-III (ESCRT-III) polymerizes into helical structures deforming the plasma membrane.

Gilles Bodon^{1,3*}, Romain Chassefeyre^{1,3*}, Karin Pernet-Gallay^{2,3}, Nicolas Martinelli⁴ Grégory Effantin⁴, David Lutje Hulsik⁴, Agnès Belly^{1,3}, Yves Goldberg^{1,3}, Christine Chatellard-Causse^{1,3}, Béatrice Blot^{1,3}, Guy Schoehn^{4,5,6,7}, Winfried Weissenhorn⁴ and Rémy Sadoul^{1,3}.

1 INSERM, U836, Equipe 2, Neurodégénérescence et Plasticité, Grenoble, F-38042, France

2 INSERM, U836, Plateforme de microscopie, Grenoble, F-38042, France

3 Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, F-38042, France

4 Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS Grenoble, F-38042, France

5 CEA Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, Grenoble F-38027 France

6 CNRS Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, Grenoble F-38027 France

7 Université Joseph Fourier Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075, Grenoble F-38027 France

Corresponding author : Rémy Sadoul, Grenoble Institute of Neuroscience, Chemin Fortuné Ferrini, BP 170, F-38042 Grenoble, France. Phone: +33 456 520 544. Fax: +33 456 520 554

*) both authors contributed equally to this work

Running title: Plasma membrane deformation by CHMP2B

Background: ESCRT proteins catalyze membrane budding and fission away from the cytosol

Results: The ESCRT-III protein CHMP2B, polymerizes into tubular helical structures deforming the plasma membrane.

Conclusion: CHMP2B, not only mediates recruitment of the ESCRT-dissociating ATPase VPS4, as previously proposed, but also moulds membranes.

Significance: ESCRT-III polymerize into a novel kind of membrane deforming filaments distinct of actin and tubulin.

Summary: The Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT-0-III) allow membrane budding and fission away from the cytosol. This machinery is used during multivesicular endosome biogenesis, cytokinesis and budding of some enveloped viruses. Membrane fission is catalyzed by ESCRT-III complexes made of polymers of Charged Multivesicular Body Proteins (CHMPs) and by the AAA-type ATPase VPS4. How and which of the ESCRT-III subunits sustain membrane fission from the

cytoplasmic surface remain uncertain. *In vitro*, CHMP2 and CHMP3 recombinant proteins polymerize into tubular helical structures, which were hypothesized to drive vesicle fission. However, this model awaits the demonstration that such structures exist and can deform membranes *in cellulo*. Here we show that depletion of VPS4 induces specific accumulation of endogenous CHMP2B at the plasma membrane. Unlike other CHMPs, overexpressed full-length CHMP2B polymerizes into long, rigid tubes that protrude out of the cell. CHMP4s relocalize at the base of the tubes, the formation of which depends on VPS4. Cryo-EM of the CHMP2B membrane tubes demonstrates that CHMP2B polymerizes into a tightly packed helical lattice, in close association with the inner leaflet of the membrane tube. This association is tight enough to deform the lipid bilayer in cases where the tubular CHMP2B helix varies in diameter or is closed by domes. Thus, our observation that CHMP2B polymerization scaffolds membranes *in vivo*, represents a first step towards demonstrating its structural role during outward membrane deformation.

Introduction

Studies in yeast have revealed that protein complexes called ESCRTs (Endosome Sorting Complexes Required for Transport) play a pivotal role in intraluminal vesicle budding inside endosomes, an essential step for the sorting of receptors towards degradation (1-3). The particularity of ESCRT complexes is to induce membrane vesiculation with a topology that is inverted compared to coated vesicles budding from a donor membrane and released into the cytosol. Four ESCRT complexes have been characterized so far: ESCRT-0, -I, -II, -III. ESCRTs 0, I and II are recruited to membranes as complexes (4). In contrast, ESCRT-III assembles sequentially and transiently at membranes, and requires VPS4 for disassembly (5). Yeast ESCRT-III is composed of 7 highly related proteins. Each of them has one to three homologs in mammals, which are grouped into 8 families designated CHMP1-7 (charged multivesicular body proteins) and IST1 (increased sodium tolerance-1). In yeast, four ESCRT-III proteins essential for vesicle release have been shown to be recruited on endosomal membranes in the following order: two Vps20p subunits (CHMP6) recruited by ESCRT-II to nucleate the assembly of two Snf7p (CHMP4A-C) spirals, which are capped by Vps24p (CHMP3) and Vps2p (CHMP2A,B) (6-8). The latter recruits VPS4 (9) (10), to catalyze disassembly of ESCRT-III (11-14). *In vitro*, yeast ESCRT-I and II are sufficient to form vesicles on GUVs and ESCRT-III induces membrane fission (15).

In mammalian cells, ESCRT complexes also play a role at the plasma membrane during cytokinesis (16-19) and budding of some enveloped viruses (20) (21-25). Although all ESCRT-III members and VPS4 are required during cell division (17), siRNA knockdown experiments indicate that only one of the two CHMP2- and one of the three CHMP4-isoforms and their direct interaction are absolutely required for virus egress (26).

Little direct evidence exists so far revealing how mammalian ESCRT-III complexes mould membranes *in vivo*. ESCRT-III proteins are small helical assemblies, auto-inhibited in the cytosol and becoming activated upon interaction with a membrane (12,27-31). One common theme between CHMP proteins is their capacity to polymerize *in vitro*. CHMP1A polymerizes into large tubes, IST1 assembles into curled

sheets (29) while CHMP4B associates into arrays of loose circular filaments (32). In contrast, CHMP3 and CHMP2A polymerize into helical tubular structures (12,29) that can be closed at one end to form dome-like structures. It has been hypothesized that the tight interaction of the dome with the membrane at the neck of the budding vesicle might lead to the closing of the neck and spontaneous membrane fission (33). In contrast to these structures observed *in vitro*, CHMP4B overexpression in cultured cells led to its assembly into circular filaments at the plasma membrane. Membrane tubes of unknown composition were emanating from the plasma membrane when CHMP4B was overexpressed together with catalytically inactive VPS4 (34). Recent evidence from HIV-1 budding suggests that although CHMP4 isoforms assemble within the neck, they do not suffice to induce membrane fission in the absence of CHMP2A or B. This suggests that CHMP2 may be the minimal fission machinery (26) requiring VPS4 to catalyze fission and virion release (35), consistent with the sequential recruitment of ESCRTs and VPS4 to the HIV-1 budding site (36).

Here we report that downregulating VPS4 leads to accumulation of endogenous CHMP2B at the plasma membrane, indicating its presence in ESCRT-III complexes formed transiently at the plasma membrane. When overexpressed, CHMP2B is recruited to the plasma membrane, where it forms long protrusions, partly depending on its capacity to bind VPS4. The capacity of CHMP2B to make plasma membrane protrusions is not shared by other CHMPs, and neither CHMP2A, CHMP3 nor CHMP4 isoforms colocalize with CHMP2B inside tubes. However, CHMP4A and B tend to relocalize at the base of CHMP2B tubes. Cryo-electron microscopy of membrane tubes shed into the cell culture supernatant, demonstrates that CHMP2B polymerizes into a tightly packed helical polymer intimately associated with the inner leaflet of the bilayer. Our results show for the first time that CHMP proteins can form tightly packed helical structures *in vivo* that associate with cellular membranes. Secondly, such structures vary in diameter to induce membrane constriction, which indirectly supports the dome model for membrane fission (33). Finally, our data demonstrate that in mammalian cells, CHMP2B is not only an adaptor protein for the recruitment of VPS4 as demonstrated in yeast, but also directly plays a structural role in

membrane scaffolding.

Experimental procedures

DNA construct: The wild-type human CHMPs (2A, 3, 4A, 4B, 4C) cDNAs were cloned from HeLa cells by RT-PCR, in frame with a C-terminal Flag inserted inside reverse primers (Table1). CHMP2B, CHMP2B^{Intron5}-Flag, and CHMP2B-Flag, CHMP2B^{L207DL210D}-Flag and CHMP2B^{L4DF5D}-Flag were generated by PCR using plasmids containing HA-CHMP2B or GFP-VPS4B as templates, introducing Stop codon or point mutations inside primers where needed (all PCR primers used in this study are described Table S1). PCR fragments were inserted inside pcDNA3.1 vector using TOPO directional cloning kit (Invitrogen).

For expression in bacteria, cDNA fragments derived from human full-length CHMP2B (wt CHMP2B and mutant L4DF5D), were subcloned in frame with a C-terminal 6x Histidine tag into the expression vector pETM-13, using NcoI and XhoI. Proteins were produced in *E. coli* strain BL21 codon plus (Invitrogen).

GPF-AMSH was a generous gift from Sylvie Urbé. pCaggs GFP-VPS4B and pCaggs GFP-VPS4^{E235Q} were described previously (37).

Reagents and antibodies: Polyclonal antibodies against the C-terminal part of CHMP2B were purchased from Abcam (ab33174). Polyclonal anti-CHMP4A (H-52) and CHMP4B (C-12) were obtained from Santa Cruz. Polyclonal anti-CHMP4B (ab105767) was from Abcam. Polyclonal antibodies against VPS4A and B were a kind gift from W.I. Sundquist (University of Utah). Monoclonal and polyclonal anti-FLAG antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal antibody against β -Tubulin was a generous gift from A. Andrieux (Inserm U836, Grenoble). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa 594-WGA and Texas Red-X -phalloidin were obtained from Molecular Probe.

Cell cultures, transfections: For immunofluorescence, HeLa cells were seeded onto sterile glass coverslips in 6-well plates (10^5 cells per well) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma), and 2 mM L-glutamine (Sigma). Cells were transfected 24 h later with 1 μ g DNA, and 6 μ l jetPEI transfection reagent (Polyplus), mixed in a final volume of 200 μ l of 150 mM NaCl. For cotransfection, 1 μ g of CHMP2B containing plasmid was mixed with 500 ng of the plasmids

encoding the other proteins. Cells were fixed and processed for immunostaining 24 or 36 h after transfection.

For actin destabilisation, cells were incubated 1 h with 1 μ M Cytochalasin D or with 0.2 mg/ml Latrunculin A (Sigma).

siRNA transfection: HeLa cells transfected with a mixture containing 10 nM of each of the previously described siRNA duplexes (38) (VPS4A: CCGAGAAGCUGAAGGAUUAtt; VPS4B: CCAAAGAAGCACUGAAAGAtt) using Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen). Cells were transfected again after 24 h and fixed 24 h later. Control cells were transfected with 20 nM of siRNA duplexes against LucGL2 (CGUACGCGGAAUACUUCGAtt).

The extent of down-regulation was estimated by western blot analysis of cell lysates.

Western immunoblotting: Cells were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete, Roche Molecular). Proteins (20 μ g total protein per lane) were separated on SDS-polyacrylamide gels (10%) and analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

Immunofluorescence: Cells were fixed and immunostained as described in (39). In brief, cells were fixed with 4% paraformaldehyde. After 3 washes in PBS, cells were permeabilized with PBS containing 0.5% Triton X-100 in blocking solution (PBS containing 5% goat pre-immune serum) for 30 min. Primary antibodies diluted in blocking solution were then incubated for 1h. After washing in PBS, cells were incubated for 1h with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594, Alexa 594-WGA or Alexa488-phalloidin. After 3 washes in PBS coverslips were rinsed in water and mounted in Mowiol.

For staining of F-actin Texas Red-X Phalloidin was incubated together with the secondary antibodies. For delineating cellular membranes, live cells were washed in HBSS, incubated 10 min at 4°C with Alexa 494-WGA (5 μ g/mL in HBSS) and washed in PBS before fixation.

Liposome Flotation Assay: Liposomes were made of synthetic 1-Stearoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (SOPC) and 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoserine (DOPS) from Avanti Polar Lipids. Lipids were homogeneously mixed in chloroform to achieve a 8/2 molar ratio. Dried thin lipid films were obtained by evaporation. Lipids were hydrated in 20 mM HEPES pH 7 to a final concentration of 2.5 mg/mL. The translucent solution was then extruded 15 times through a 200 nm

polycarbonate membrane (Avanti Polar Lipids). The average diameter of the liposomes was estimated to range between 200 to 400 nm by dynamic light scattering measurement and electron microscopy.

Proteins and large unilamellar vesicles (LUVs) were incubated overnight. The solution was mixed with an equal volume of 80% (w/v) sucrose in 20 mM HEPES pH 7 resulting in a final sucrose concentration of 40% (w/v) with a final LUV concentration of 0.625 mg/mL. 300 μ L of this solution was overlaid with 100 μ L of 30, 20 and 10% (w/v) sucrose in no-salt buffer. The gradient was then subjected to ultracentrifugation at 190 000 g for 6 h at 4°C. After ultracentrifugation, gradients were separated into seven fractions. Sucrose concentration of each fraction was determined by refractometry; one third of each fraction was analyzed by SDS-PAGE.

Confocal microscopy Images of fluorescent cells were acquired with a Zeiss LSM-710 laser scanning confocal microscope with a 63x Plan-Apochromat objective (NA 1.4). Laser power was adjusted to maximize the dynamic range of each sample. For dual-color samples, the adjustable spectral window of fluorescence collection was set for each channel with a singly colored control sample, so that cross-contamination between channels was avoided. Since CHMP2B tubes protrude out of the cell in a large Z range, stacks of optical sections were acquired with the required electronic magnification. Image files were processed with ImageJ. Except when mentioned, images represent maximum intensity projections.

CHMP2B tube purification: For isolation of CHMP2B tubes, HeLa cells were seeded in 10 cm culture dishes (approximately 10^6 cells/well). The culture medium was the same as mentioned above, except that FBS was previously cleared by 60 000 g centrifugation to remove potential contaminants. Cells were transfected 24 h later with 3 μ g DNA, and 18 μ L jetPEI transfection reagent (Polyplus-transfection), mixed in a final volume of 600 μ L of 150 mM NaCl. Culture media harvested 36 h after transfection were centrifuged twice at 300 g for 5 min to remove debris and then at 30 000 g (1 h) to pellet membranes. The resulting pellet (P1) was washed once with HBS (150 mM NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.4), resuspended and incubated for 30 min at 4°C in HBS containing 1 mM AMPPnP (SIGMA), completeTM protease inhibitor (Roche Applied Science), and 1%

Triton X100. Half of this suspension was centrifuged at 20 000 g for 30 min, the pellet (P2) was re-suspended in the same volume as S2. Identical volumes of P1, S2, P2 were analyzed by western blot together with the cell lysate (20 μ g proteins estimated using BCA protein assay reagent (Pierce).

Electron microscopy:

Immuno-EM analysis of CHMP2b expressing cells: Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1M, pH 7.3 during 2 h. Cells were then gently detached using a cell scraper, centrifuged at 1200 rpm during 5 minutes and embedded in 10% gelatine. The cell pellet was then cut into 1 mm³ pieces. These samples were cryoprotected during 4 h in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Ultrathin cryosections of 40 nm were made at -120°C using an ultra-cryo-microtome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methylcellulose according to the Tokuyasu protocol (40). Cryosections were first incubated with primary polyclonal anti-Flag antibody (Sigma), and revealed with protein A-gold conjugate (CMC, Utrecht). Double immunogold labeling was performed sequentially using 15 nm protein A gold to recognize anti-CHMP4A and 10 nm protein A gold to detect CHMP2B. Labeled cryosections were viewed at 80 kV with a 1200EX JEOL TEM microscope and images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus).

Negative staining: P1 pellet obtained from the culture media of ten 100 mm dishes of HeLa cells transfected with CHMP2B-Flag were resuspended in 80 μ L HBS. 6 μ L of this sample was incubated during 10 minutes on an EM grid coated with Formvar and carbon. Grids were then quickly blotted and washed 3 times in water before staining with 1% uranyl acetate during 1 min, followed by blotting to remove excess liquid. For immunolabeling, samples were permeabilized with Triton X100 1% during 20 minutes and labeling was performed after extensive washing with water using an anti-CHMP2B antibody against the whole protein. Protein A gold (CMC, Utrecht) was used to reveal the antibody. Finally, grids were stained with 1% uranyl acetate pH 4 during 1 minute. Grids were viewed under a transmission electron microscope (JEOL 1200EX) and images acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus).

Cryo-EM: P1 pellets obtained from the culture medium of thirty 100 mm dishes were resuspended in 40 μ l HBS. 4 ml of sample were loaded onto a Quantifoil R2/1 holey grid (Quantifoil Micro Tools GmbH, Germany), blotted for 1 to 2 s to remove the excess liquid and then rapidly plunged into liquid ethane cooled using liquid nitrogen. The frozen grid was transferred into a FEI Tecnai Polara electron microscope. Images were taken under low dose conditions at 300 kV (less than 10 $e^-/\text{\AA}^2$) and with a nominal magnification of 45 000 and a defocus between 2 and 3 μ m using a CCD camera (GATAN ultrascan 4000).

2D average: Two-dimensional averaging of particles was performed by selecting a total of 35 boxes (900 x 900 pixels) equally spaced along one tube using the x3d program (41) and averaging them together after cross-correlation using SPIDER (42)

Results

CHMP2B localizes to the plasma membrane upon VPS4 knock-down.

Immunostaining of CHMP4A, B and 2B revealed that all endogenous proteins were homogeneously distributed throughout the cytoplasm. siRNA knock-downs of VPS4A and VPS4B (Fig. S2A) led to a relocalization of cytosolic CHMP4A and CHMP4B to intracellular patches, possibly reflecting their accumulation at the surface of endosomes (Fig. 1 A,B). In contrast, similar depletion of VPS4 led to relocalization of endogenous CHMP2B from the cytoplasm into patches, which were associated with the plasma membrane in some cells (Fig. 1C, D and S2B). This suggests that VPS4 is required to dissociate plasma membrane based ESCRT-III complexes containing CHMP2B and thus intimately controls ESCRT-III activity at the plasma membrane.

Expression of wild type CHMP2B induces cell surface protrusions.

Overexpressed CHMP2B was homogeneously distributed throughout the cytoplasm. However, in 10 % of cells, the cytoplasmic staining was partially or entirely lost and CHMP2B was relocated to the plasma membranes, producing long protrusions pointing out into the culture medium (Fig. 2A). Some protrusions had a length of up to several tens of microns. Fusion of a Flag peptide to the C-terminal part of CHMP2B increased the capacity of the protein to assemble into surface protrusions, which were detected in about 40%

of CHMP2B-Flag positive cells (Fig. 2A, B). Projection in the x-z plane (Fig. 2A) and 3D reconstruction (S1 and S2 videos) of cells expressing CHMP2B or CHMP2B-Flag, show that the tubes protrude on the sides and above the cell and are rarely attached to the cell culture substrate. In some cases however, CHMP2B protrusions detached from the cell surface were observed lying on the cell culture substrate.

Immunoelectron microscopy of CHMP2B-Flag expressing cells demonstrated the presence of tubular, electron dense structures covered by a single membrane (Fig. 2E, F). The hollow electron dense structures were labeled with Flag antibodies revealing the presence of CHMP2B along the entire length of the tubes (Fig. 2F). In tube cross sections Flag immunolabeling was seen in the lumen of the tubes indicating that the C-terminal part of CHMP2B points towards the interior of the tubular structure (Fig.2E).

Expression of CHMP2B also induced the formation of tubes in HEK 293T cells (not shown). CHMP2B expressed in post-mitotic neurons also deformed the membrane into protrusions in which it accumulates (Fig. S3A). This demonstrates that CHMP2B protrusions do not result from cell retraction occurring during cell migration or division.

The N-terminal end of CHMP2B is required to deform the plasma membrane.

In contrast to CHMP2B-Flag and wild-type CHMP2B, N-terminally-Flag-tagged CHMP2B (Flag-CHMP2B) remained cytoplasmic and failed to induce growth of surface protrusions (Fig. 2B, C). Similarly, an HA-tag fused to the N-terminus blocked the capacity of CHMP2B to induce membrane tubulation (not shown). Western blot analysis showed similar levels of expression of CHMP2B, Flag-CHMP2B or CHMP2B-Flag (Fig. S3B) demonstrating that the inability of N-terminally tagged versions of CHMP2B to induce tubule formation is not due to differences in their expression level.

Based on these observations, we reasoned that the N-terminal part of the protein might be crucial for deforming membranes. The CHMP2B N-terminal 8 amino-acids are conserved throughout the CHMP family. In particular Leu4 and Phe5 of CHMP2B, followed by a cluster of positively charged residues (Lys and Arg) are conserved within all CHMPs (Fig. S1B). Expression of the double mutant L4D/F5D (CHMP2B^{L4DF5D}-Flag) did not deform the plasma membrane into protrusions (Fig. 2B, C). In order to test whether these mutations affect

membrane binding, a liposome flotation assay was employed using purified recombinant CHMP2B and CHMP2B^{L4DF5D}. The presence of CHMP2B in the upper fractions demonstrated the capacity of the protein to interact with liposomes (Fig. 2D). In contrast, most CHMP2B^{L4DF5D} stayed in the bottom fraction demonstrating that the L4D/F5D mutation impairs CHMP2B lipid bilayer interaction *in vitro*. These data confirm the requirement of an intact N-terminus for CHMP2B function.

Co-expression of CHMP4 with CHMP2B affects CHMP2B's capacity to induce membrane tubulation.

Because formation of CHMP2B cell protrusions depends on an intact N-terminus, we re-examined the expression of C-terminally Flag-tagged CHMP2A, CHMP3 and the CHMP4A, B and C isoforms. None of them induced membrane protrusions when expressed alone. Although CHMP2A and CHMP3 polymerize into tubes *in vitro*, no such structures could be observed *in vivo* upon co-expression of CHMP2A-Flag and CHMP3-Flag (not shown). CHMP4 co-expressed with CHMP2B abolished CHMP2B protrusions and led to relocalization of CHMP2B to CHMP4-containing structures (Fig. 3A). In contrast, neither CHMP2A nor CHMP3 abolished formation of CHMP2B protrusions (not shown). These observations thus suggest that CHMP4 isoforms regulate CHMP2B's capacity to polymerize and deform the plasma membrane.

Immunostaining with antibodies against CHMP4A and CHMP4B of CHMP2B-overexpressing cells revealed that the endogenous proteins were both recruited at the base of CHMP2B protrusions (Fig. 3B, C and video S3). This localization was confirmed using double immunogold labeling of CHMP2B-Flag expressing cells with anti-Flag and anti-CHMP4A antibodies: CHMP4A was confined to a dense core material at the base of the tube whereas CHMP2B was distributed along the entire length (Fig. 3D).

CHMP2B membrane tube formation is regulated by VPS4.

The C-terminal MIT domain-interacting motif (MIM) of CHMP2B recruits the ATPase VPS4 (9). Accordingly, we found that GFP-VPS4B decorated the entire length of CHMP2B-containing protrusions (Fig. 4A). In contrast, the ubiquitin hydrolase GFP-AMSH, which binds to the MIMs of CHMP1A, B, 2A and 3, but not that of CHMP2B, (28,43), was absent from

CHMP2B protrusions (Fig. 4A). This further indicates that none of these proteins take part in the making of CHMP2B protrusions.

We next tested whether VPS4 binding to CHMP2B is necessary for its membrane tubulating activity. Here we used a CHMP2B double mutation L207D/L210D (CHMP2B^{L207DL210D}-Flag) which impairs VPS4B recruitment (9) (Fig. S1). CHMP2B^{L207DL210D}-Flag did not co-localize with GFP-VPS4B confirming its inability to bind the ATPase (Fig. 4B). Unexpectedly, CHMP2B^{L207DL210D}-Flag was concentrated inside patches but almost never induced tube formation. This observation suggests that VPS4 is required for the formation or integrity of CHMP2B tubes. However, a CHMP2B mutant (CHMP2B^{intron5}), which lacks part of the C-terminus including the MIM domain, formed patches at the plasma membrane like CHMP2B^{L207DL210D}-Flag but nevertheless polymerized efficiently into membrane tubes (Fig. 4B). GFP-VPS4B was not detected inside tubes made of CHMP2B^{intron5}-Flag. We conclude that interaction of VPS4 to the C-terminal MIM domain is required for full-length CHMP2B to form membrane tubes. This was further supported by the fact that co-expressing catalytically inactive VPS4B (VPS4^{E235Q}) with CHMP2B, strikingly increased the number of cells making tubes compared to cells expressing CHMP2B only (Fig. 4C). The requirement for the VPS4-CHMP2B interaction can be overcome by deletion of the C-terminal part which is thought to release autoinhibition as in the case of CHMP2B^{intron5}. Thus, VPS4 interaction might be necessary to release the autoinhibition in full-length CHMP2B, a process that is required to induce CHMP membrane association and polymerization. However, it is not necessary to form or maintain the structures of the protrusions.

Relationship between CHMP2B and actors of membrane deformation

Classically, actin and tubulin underlie plasma membrane protrusions. No immunostaining of β -tubulin was detected inside CHMP2B tubes (Fig. 5A). Absence of microtubules inside CHMP2B protrusions was also obvious from the electron-microscopy data (Fig. 2E). Thus CHMP2B-induced protrusions are not related to microvilli or other protrusions made by microtubules.

F-actin stained by Phalloidin was almost never present inside CHMP2B protrusions demonstrating that it is not necessary to keep them intact (Fig. 5B). The lack of a structural

role of actin for maintaining CHMP2B protrusions was confirmed by the fact that latrunculin A (Fig. 5C) or cytochalasin D (not shown), which dramatically disrupted the actin cytoskeleton, did not affect their integrity. Our observations thus demonstrate that CHMP2B assembly can scaffold plasma membrane tubes independently of actin and tubulin.

Membrane tubes made of CHMP2B are resistant to detergent.

Because CHMP2B protrusions are often found shed from HeLa cells, we collected them from the culture medium of CHMP2B expressing cells. After low speed centrifugation, media were centrifuged at 30 000g. The pelleted material (P1) was solubilized in 1% Triton X-100 and centrifuged at 20 000 g (P2 and S2). Western blot analysis demonstrated the presence of large amounts of CHMP2B in the P1 pellets, the vast majority remaining insoluble in Triton-X100 (Fig. 6A). This is in good agreement with the known resistance of ESCRT-III complexes to non-ionic detergents. No CHMP2B immunopositive material was recovered from P1 or P2 pellets prepared from cell supernatants of cells transfected with CHMP2B^{L4DF5D-Flag} in accordance with the inability of the mutant to make tubes.

EM examination of P1 pellets negatively stained with uranyl acetate demonstrated the presence of numerous rigid tubes surrounded by plasma membrane (not shown). Their diameter ranged from 70 to 350 nm. No such tubes could be seen in similar supernatants of untransfected cells. Immunogold labeling performed after permeabilization, revealed the presence of CHMP2B along the entire length of the tubes (Fig. 6B).

Cryo-EM observation reveals CHMP2B polymerized into a tightly packed helical structure.

We next observed CHMP2B tubes present in P1 pellets using cryo-EM to better characterize their structure (Fig. 6C-F and S4). In these conditions, the diameter of the tubes ranged from 100 to 400 nm. Regular striations perpendicular to the longitudinal axis of the tube could be revealed. The hollow nature of the tubes was demonstrated as they were sometimes filled with small vesicles (Fig. 6D). Regardless of the diameter of the tubes, the striations of CHMP2B tubes were regular (Fig. 6D-F and S4) and spaced by a 32 Å gap as determined by Fourier transform of an image, indicating a helical structure with a pitch of 32 Å (Fig. S4). The

CHMP2B protein lattice was tightly linked to the internal leaflet of the membrane derived from the plasma membrane. In some cases the tube was constricted for example from a diameter of ~ 80 nm to ~ 16 nm. Because the lateral striation remains well visible, constriction is most likely induced by gradually reducing the number of CHMP2B protomers per helical turn (Fig. 6E). Sometimes tubes had a succession of two uniform segments with different diameters (not shown) or presented closed ends with continuous membrane (Fig 6F, S4). These analyses show that CHMP2B assembles into a helical polymer to deform the membrane into tubes with variable diameters.

Discussion

ESCRT-III catalyzes membrane budding and fission processes during MVB biogenesis, cytokinesis and enveloped virus budding (25,44,45). In yeast sequential assembly of VPS20p (CHMP6), Snf7p (CHMP4), Vps24p (CHMP3) and Vps2p (CHMP2) is required for function whereas SNF7p was suggested to constitute the driving force of membrane fission (6-8). The importance of Snf7 was further highlighted by giant unilamellar vesicles (GUV) budding assays showing that vesicles can be released into the lumen of the GUV by yeast ESCRT-III Vps20p (CHMP6), Snf7p (CHMP4) and Vps24p (CHMP3) (15). However, the mammalian system might differ in that CHMP4 still plays a crucial role but requires in addition CHMP2 to catalyze membrane fission: although CHMP4 isoforms are recruited to the interior of the membrane neck of budding HIV-1 virions, virions are not released in the absence of both CHMP2 isoforms (17). Furthermore, VPS4 is recruited last and before virion release (35,36). Similarly CHMP4 in conjunction with CHMP2A have been implicated in constriction and membrane fission at the cytokinetic midbody (17,19,46). Thus both CHMP4 and CHMP2 play important roles in HIV-1 release and cytokinesis.

Here we show that overexpression of intact CHMP2B is sufficient to induce the formation of membrane tubes protruding from the cell surface. The capacity of CHMP2B to make cell protrusions and to bind to membranes *in vitro* depends on an intact N-terminal end suggesting that this domain participates in the regulation of the interaction between the lattice and the inner membrane leaflet. Even though membrane recruitment of, and deformation by CHMP2B were easily observed in the present experiments,

this property has escaped detection in previous studies. This can be explained by the fact that all the other studies used tagging of the protein at the N-terminus, which clearly abolishes its capacity to form plasma membrane tubes.

Even if CHMP proteins vary extensively in their primary sequence, they share a common folded structure with an N-terminal basic domain interacting with the C-terminal acidic regulatory domain. Because CHMPs are cytosolic, they require an activation step to polymerize on membranes (12,27-29). The autoinhibition is thought to be lifted by displacement of the C-terminal region from the N-terminal core, which subsequently permits polymerization at membranes. The fact that wild type CHMP2B is able to form tubes indicates that the protein needs to be activated prior to polymerization at the plasma membrane. The AAA-ATPase VPS4 could be part of this activation through binding to the C-terminal MIM domain of CHMP2B, thus releasing auto-inhibition. A similar mechanism has already been described for activation of CHMP3 by AMSH (28). Indeed mutations in the VPS4 binding site of CHMP2B prevent membrane tube formation. Furthermore, co-expression with catalytically inactive VPS4B increases the propensity of CHMP2B to polymerize into tubes. In humans, dominant mutations in CHMP2B cause frontotemporal dementia (FTD) (47-49). One mutation generates a distinct aberrant transcript, *CHMP2B^{intron5}*, which encodes a protein lacking the $\alpha 6$ helix thus rendering the protein constitutively active. *CHMP2B^{intron5}* mutant induces tube formation demonstrating that the lack of VPS4 binding can be overcome by the absence of the C-terminal regulatory domain.

On the other hand, the ATPase activity of VPS4 is known to regulate the dissociation of ESCRT-III complexes (11,13,14). Accordingly, downregulation of VPS4A and B revealed the accumulation of cytoplasmic CHMP4A-containing ESCRT-III complexes. In contrast, the same downregulation led to preferential accumulation of endogenous CHMP2B in plasma membrane patches. This suggests that ESCRT-III complexes forming transiently at the plasma membrane are major sites of CHMP2B polymerization. Altogether our results suggest that VPS4 plays a dual regulatory role: binding to CHMP2B would structurally favor polymerization into tubes, whereas its ATPase activity depolymerizes plasma membrane ESCRT-III complexes. *CHMP2B^{intron5}*

polymerization would escape control by VPS4 potentially contributing to its pathogenic activity (39).

A remarkable finding was the recruitment of endogenous CHMP2B in VPS4 knocked-down cells at the plasma membrane, which correlates well with the fact that the overexpressed protein makes tubes only at the cell surface. This preferential recruitment of CHMP2B at the plasma membrane could explain our recent observation in neurons of its involvement in the shaping of dendritic spines, which are small protrusions corresponding to post synaptic parts of synapses (39). It is also in good agreement with the crucial role played by CHMP2s in HIV-1 virus egress (26).

None of the CHMPs tested so far, including the closest homolog CHMP2A, polymerized into tubes or copolymerized with CHMP2B on the plasma membrane, although they all tended to concentrate at their base. However, using co-transfection experiments, only CHMP4 isoforms had a drastic effect in blocking CHMP2B tubulating activity. The dominant negative effect of CHMP4 on CHMP2B tube formation may be explained by sequestering of CHMP2B by the overexpressed CHMP4. On the other hand, the presence of CHMP4 at the base of the tubes suggests that it also plays a positive role in that it sets the stage for CHMP2B membrane polymerization. Similarly, CHMP2 isoforms have no effect on HIV-1 budding in the absence of CHMP4 isoforms consistent with the absence of CHMP2 in the membrane necks of budding virions in the absence of CHMP4 (26).

Recruitment of Flag-CHMP4B at the plasma membrane has already been observed using “deep etched” electron microscopy. In this case the protein polymerized into filaments, which self-associated into circular arrays underneath the plasma membrane (34). Expression of C-terminal deleted CHMP4A or B or co-expression of the full length protein together with an ATPase dead version of VPS4 (*VPS4B^{E235Q}*) led to the appearance of buds and tubes pointing out of the cells. The identity of the CHMPs making these hollow tubes was not defined, but our results open the possibility that they represent CHMP2B polymers.

Cryo-EM analyses of isolated membrane tubes demonstrated the presence of a protein lattice in close association with the inner leaflet of the tube membrane. Immunogold labeling indicates that the protein lattice is made of CHMP2B, confirming the immunofluorescence

staining of CHMP2B along the entire length of cellular membrane tubes. The CHMP2B protein lattice present in the tubes displays a lateral striation that is produced by helical symmetry; thus tube formation most likely followed the biophysical principle of membrane buckling as proposed for ESCRT-III polymer assembly (50). The pitch of the helix was determined by cryo EM to be 32 Å. Furthermore, immunogold labeling revealed that the arrangement of CHMP2B within the helix must be such that the C-terminal part points inside the lumen. These characteristics have already been observed in the case of CHMP2A/CHMP3 tubular structures assembled *in vitro* in the absence of membranes (12) indicating common structural principles for CHMP polymerization. The CHMP2B tubes varied in diameter and the CHMP2B lattice was able to constrict the membrane tube down to a diameter of 16 nm; furthermore, tube ends are closed and often reveal dome-like structures covered with continuous membrane. The induced membrane constriction and the observation of

tubes with dome-like structural ends tightly covered by membrane, indirectly support the following membrane fission model: the building up of a dome-like CHMP protein lattice attracts and bends membranes sufficiently to induce neck thinning leading to spontaneous membrane fission (33). Furthermore our observations are in agreement with the tomography data that present spiral CHMP2A tubes at the cytokinetic midbody with a diameter of 17 nm (46). Thus both CHMP2A and CHMP2B can constrict membranes to narrow diameters. Because none of the other CHMPs have yet been shown to induce membrane constriction it is tempting to speculate that CHMP2 polymers catalyze the final membrane fission step, as suggested for HIV-1 budding (26), by providing sufficient membrane bending energy that leads to close apposition of the membranes within the membrane neck of a virus or vesicle or within the midbody structure.

References

1. Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B., and Emr, S. D. (2002) *Dev Cell* **3**, 283-289
2. Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., and Emr, S. D. (2002) *Dev Cell* **3**, 271-282
3. Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D. (2001) *Cell* **106**, 145-155
4. Hurley, J. H. (2010) *Crit Rev Biochem Mol Biol*
5. Shestakova, A., Hanono, A., Drosner, S., Curtiss, M., Davies, B. A., Katzmann, D. J., and Babst, M. (2010) *Mol Biol Cell* **21**, 1059-1071
6. Teis, D., Saksena, S., and Emr, S. D. (2008) *Dev Cell* **15**, 578-589
7. Teis, D., Saksena, S., Judson, B. L., and Emr, S. D. (2010) *Embo J* **29**, 871-883
8. Saksena, S., Wahlman, J., Teis, D., Johnson, A. E., and Emr, S. D. (2009) *Cell* **136**, 97-109
9. Stuchell-Brereton, M. D., Skalicky, J. J., Kieffer, C., Karren, M. A., Ghaffarian, S., and Sundquist, W. I. (2007) *Nature* **449**, 740-744
10. Obita, T., Saksena, S., Ghazi-Tabatabai, S., Gill, D. J., Perisic, O., Emr, S. D., and Williams, R. L. (2007) *Nature* **449**, 735-739
11. Lin, Y., Kimpler, L. A., Naismith, T. V., Lauer, J. M., and Hanson, P. I. (2005) *J Biol Chem* **280**, 12799-12809
12. Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H. G., and Weissenhorn, W. (2008) *Science* **321**, 1354-1357
13. Babst, M., Sato, T. K., Banta, L. M., and Emr, S. D. (1997) *EMBO J* **16**, 1820-1831
14. Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J., and Emr, S. D. (1998) *EMBO J* **17**, 2982-2993
15. Wollert, T., and Hurley, J. H. (2010) *Nature* **464**, 864-869
16. Carlton, J. G., and Martin-Serrano, J. (2007) *Science* **316**, 1908-1912
17. Morita, E., Colf, L. A., Karren, M. A., Sandrin, V., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12889-12894
18. Morita, E., Sandrin, V., Chung, H. Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. (2007) *Embo J* **26**, 4215-4227
19. Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H., and Lippincott-Schwartz, J. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4846-4851

20. Usami, Y., Popov, S., Popova, E., Inoue, M., Weissenhorn, W., and H, G. G. (2009) *Biochem Soc Trans* **37**, 181-184
21. Demirov, D. G., and Freed, E. O. (2004) *Virus Res* **106**, 87-102
22. Morita, E., and Sundquist, W. I. (2004) *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 395-425
23. Bieniasz, P. D. (2009) *Cell Host Microbe* **5**, 550-558
24. Martin-Serrano, J., Zang, T., and Bieniasz, P. D. (2003) *J Virol* **77**, 4794-4804
25. Martin-Serrano, J., and Neil, S. J. (2011) *Nat Rev Microbiol* **9**, 519-531
26. Morita, E., Sandrin, V., McCullough, J., Katsuyama, A., Baci Hamilton, I., and Sundquist, W. I. (2011) *Cell Host Microbe* **9**, 235-242
27. Muziol, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R. B., Zamborlini, A., Usami, Y., Gottlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006) *Dev Cell* **10**, 821-830
28. Zamborlini, A., Usami, Y., Radoshitzky, S. R., Popova, E., Palu, G., and Gottlinger, H. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19140-19145
29. Bajorek, M., Schubert, H. L., McCullough, J., Langelier, C., Eckert, D. M., Stubblefield, W. M., Uter, N. T., Myszka, D. G., Hill, C. P., and Sundquist, W. I. (2009) *Nat Struct Mol Biol* **16**, 754-762
30. Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H. G., Svergun, D. I., and Weissenhorn, W. (2008) *J Mol Biol* **378**, 818-827
31. Shim, S., Kimpler, L. A., and Hanson, P. I. (2007) *Traffic* **8**, 1068-1079
32. Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., Boyer, V., Sadoul, R., Forest, E., Svergun, D. I., Gottlinger, H. G., and Weissenhorn, W. (2009) *Structure* **17**, 843-856
33. Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J. D., Briggs, J. A., Weissenhorn, W., and Kozlov, M. M. (2009) *PLoS Comput Biol* **5**, e1000575
34. Hanson, P. I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J. E. (2008) *J Cell Biol* **180**, 389-402
35. Baumgartel, V., Ivanchenko, S., Dupont, A., Sergeev, M., Wiseman, P. W., Krausslich, H. G., Brauchle, C., Muller, B., and Lamb, D. C. (2011) *Nat Cell Biol* **13**, 469-474
36. Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P. D., and Simon, S. M. (2011) *Nat Cell Biol* **13**, 394-401
37. Mahul-Mellier, A. L., Strappazon, F., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Beal, D., Torch, S., Hemming, F., Petiot, A., Verna, J. M., Fraboulet, S., and Sadoul, R. (2009) *Biochem Soc Trans* **37**, 200-203
38. Morita, E., Colf, L. A., Karren, M. A., Sandrin, V., Rodesch, C. K., and Sundquist, W. I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12889-12894
39. Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Bouron, A., Sadoul, R., and Goldberg, Y. (2010) *J Cell Sci* **123**, 2943-2954
40. Liou, W., Geuze, H. J., and Slot, J. W. (1996) *Histochem Cell Biol* **106**, 41-58
41. Conway, J. F., and Steven, A. C. (1999) *J Struct Biol* **128**, 106-118
42. Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., and Leith, A. (1996) *J Struct Biol* **116**, 190-199
43. Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2006) *J Biol Chem* **281**, 23083-23091
44. Hurley, J. H., and Hanson, P. I. (2010) *Nat Rev Mol Cell Biol*
45. Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., and Weissenhorn, W. (2011) *Trends Biochem Sci* **36**, 199-210
46. Guizetti, J., Schermelleh, L., Mantler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Muller-Reichert, T., and Gerlich, D. W. (2011) *Science*
47. Skibinski, G., Parkinson, N. J., Brown, J. M., Chakrabarti, L., Lloyd, S. L., Hummerich, H., Nielsen, J. E., Hodges, J. R., Spillantini, M. G., Thusgaard, T., Brandner, S., Brun, A., Rossor, M. N., Gade, A., Johannsen, P., Sorensen, S. A., Gydesen, S., Fisher, E. M., and Collinge, J. (2005) **37**, 806-808
48. Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E. M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., and Simonsen, A. (2007) *J Cell Biol* **179**, 485-500
49. Lee, J. A., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G., and Gao, F. B. (2007) *Curr Biol* **17**, 1561-1567
50. Lenz, M., Crow, D. J., and Joanny, J. F. (2009) *Phys Rev Lett* **103**, 038101

Acknowledgments:

G. B. and R.C. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, G.B. and A.B. by the Fondation France Alzheimer, N.M. by the région Rhône-Alpes (Cluster 10 infectiologie), G.E. by the Agence Nationale de la Recherche (ANR). This work was funded by INSERM, CNRS, Université Joseph Fourier, Fondation France Alzheimer and ANR (08-Blanc-0271 to W.W. R.S. and G.S.). We acknowledge the support by the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB) and the GIS-IBISA platform for access to the Polara microscope. We thank W.I. Sundquist and S. Urbé for generous gift of reagents, D. Béal for technical assistance, F. Hemming for critical reading of the manuscript and all members of the lab for helpful suggestions.

Figure 1

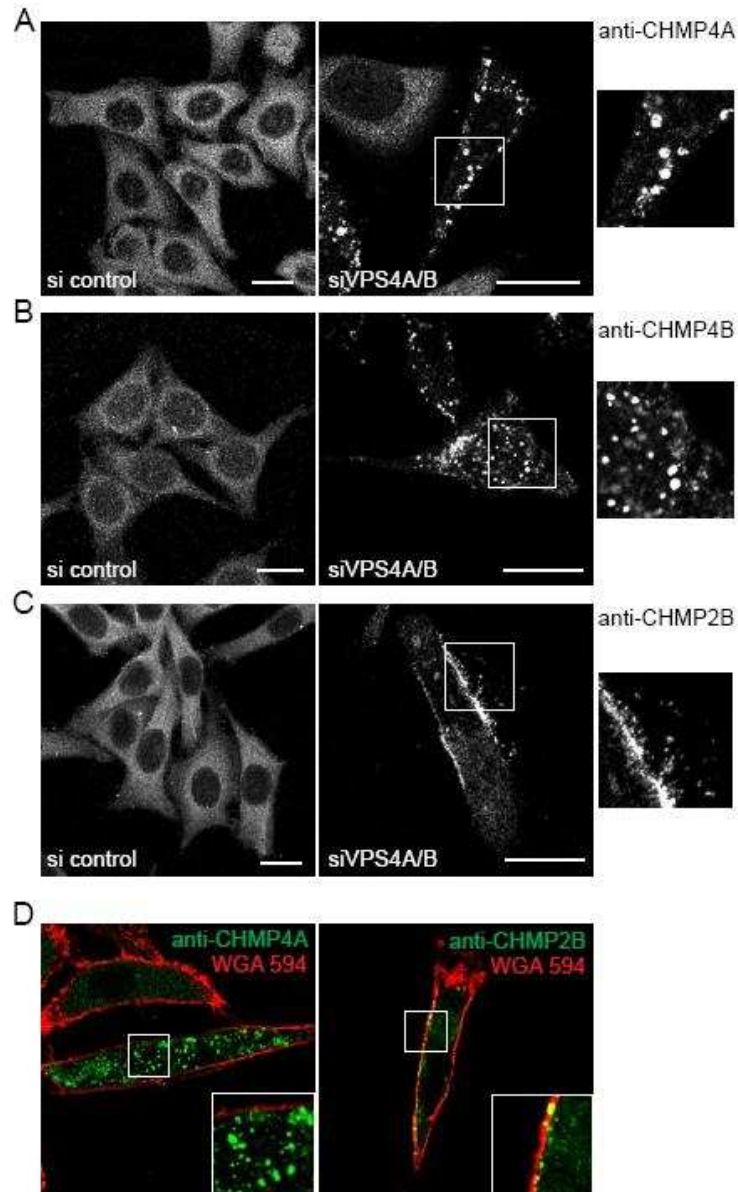


Figure Legends

Figure 1: VPS4A and B downregulation induces plasma membrane accumulation of endogenous CHMP2B. HeLa cells were depleted of VPS4A and VPS4B using a mixture of SiRNA against both proteins (right panels). Control cells were transfected with an irrelevant SiRNA (left panels). Confocal section of control cells or of cells depleted of VPS4, immunostained with antibodies against CHMP4A (A), CHMP4B (B), or CHMP2B (C). Enlargements of the boxed regions are shown on the right. (D) Confocal sections of VPS4 depleted cells treated with Alexa 594-WGA to delineate membranes. Cells were immunostained using anti-CHMP4A (left panel) or anti-CHMP2B (right panel). Bars: 20 μ m.

Figure 2

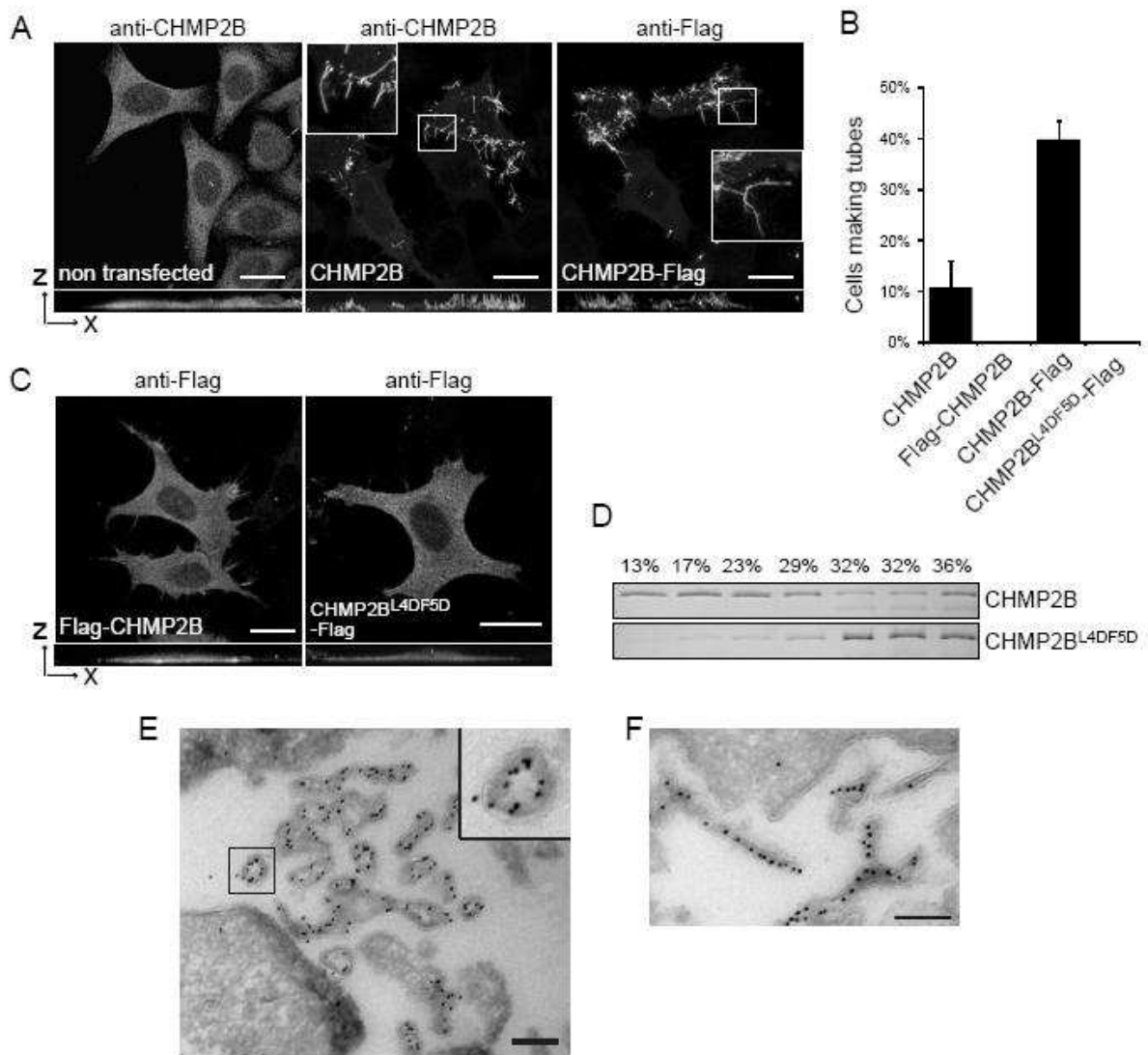


Figure 2: Overexpression of CHMP2B or CHMP2B-Flag induces formation of long cell surface protrusions in which they concentrate. HeLa cells were transfected with the indicated plasmids and immunostained 36 h later. Except otherwise stated, photographs presented in all figures are maximal intensity projections of confocal image stacks. In A and C bottom panels represent projections in the x-z plane. Bars: 20 μ m. (A) CHMP2B immunostaining of cells transfected with the empty vector reveals a homogeneous cytoplasmic localization of the protein. Overexpression of CHMP2B and CHMP2B-Flag induces the formation of cell surface protrusions, in which CHMP2B concentrates. Note the absence of cytoplasmic staining in tube forming cells. (B) Percentage of transfected cells displaying tubes as revealed with anti-CHMP2B antibodies. For each condition, 200 CHMP2B-expressing cells were counted. Data from 3 independent experiments are plotted. Standard error bars are shown. (C) Flag-CHMP2B and CHMP2B^{L4DF5D}-Flag do not induce surface protrusions. (D) Flotation experiments demonstrate that mutations in L4-F5 impair the capacity of CHMP2B to associate with membranes *in vitro*. Purified recombinant full-length CHMP2B and CHMP2B^{L4DF5D} were mixed with liposomes. Liposomes were floated on a sucrose gradient, fractions run on SDS-PAGE and proteins revealed by Coomassie staining. (E, F) Flag Immunogold labeling of cells overexpressing CHMP2B-Flag. Cross sections of tubes reveal the presence of the C-terminal Flag lining the lumen of a hollow, electron-dense structure closely associated with the membrane of tubes; longitudinal sections reveal the presence of CHMP2B along the entire length of the tubes. Bars: 200 nm.

Figure 3

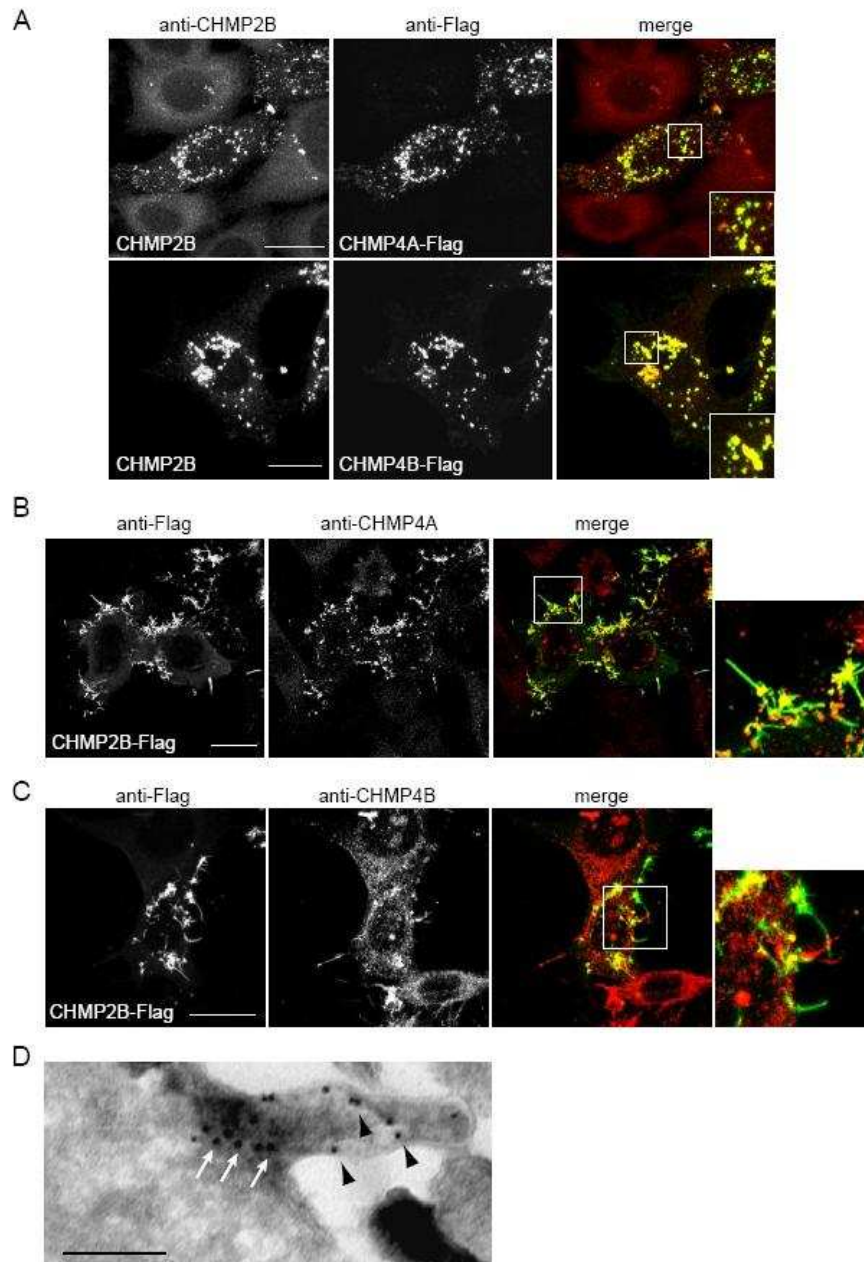


Figure 3: Relationship between CHMP4s and CHMP2B induced protrusions. HeLa cells were transfected with the indicated plasmids and immunostained 36 h later. (A) CHMP4A-Flag or CHMP4B-Flag, co-expressed with similar amounts of CHMP2B, block the capacity of CHMP2B to form protrusions. Note the relocalization of CHMP2B inside CHMP4A or CHMP4B patches. In cells expressing CHMP2B-Flag only, immunostaining with anti-CHMP4A (B) or anti-CHMP4B (C) antibodies reveals the relocalization of endogenous CHMP4A and CHMP4B at the base of CHMP2B tubes. The right panels show enlargement of the boxed regions in the merged panels. In all cases, Bars: 20 μ m. (D) Double immunogold labeling of a tube emanating from a cell overexpressing CHMP2B-Flag: anti-FLAG staining (10 nm beads, black arrow heads) reveals the presence of CHMP2B along the entire length of the tube; anti CHMP4A (15 nm beads, white arrows) reveals CHMP4A labeling restricted at the base of the tube. Bars: 200 nm.

Figure 4

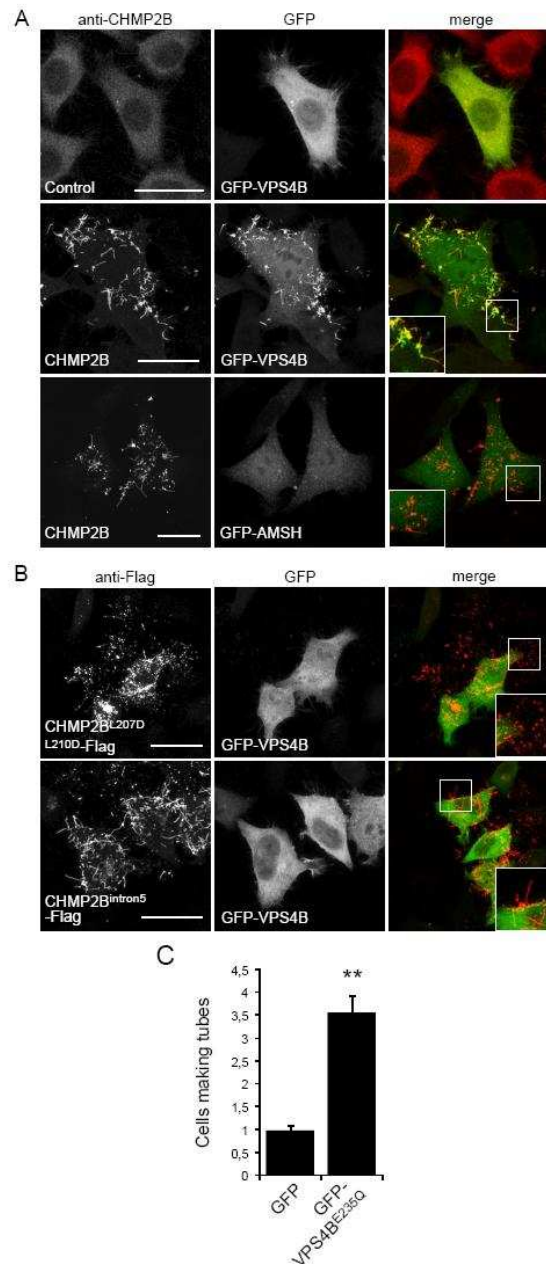


Figure 4: Relationship between VPS4 and CHMP2B protrusions. HeLa cells were co-transfected with the indicated plasmids and observed 36 h later. (A) In cells transfected with the control plasmid together with GFP-VPS4, VPS4 is homogeneously distributed in the cytoplasm. In cells expressing both GFP-VPS4B and CHMP2B, VPS4 is mainly present inside CHMP2B tubes. In contrast, AMSH is not recruited inside CHMP2B protrusions made by cells expressing both GFP-AMSH and CHMP2B. (B) CHMP2B^{L207D-L210D}-Flag, mutated in the MIM domain, accumulates in plasma membrane patches but does not induce protrusions. CHMP2B^{intron5}, which lacks the C-terminal $\alpha 6$ helix containing the MIM domain, forms everted tubes. GFP-VPS4 is recruited neither inside CHMP2B^{L207DL210D}-Flag patches nor inside CHMP2B^{intron5}-Flag containing tubes. (C). The catalytically inactive form of VPS4B (GFP-VPS4B^{E235Q}) increases the proportion of cells displaying CHMP2B protrusions: HeLa cells were transfected with CHMP2B together with GFP-VPS4B^{E235Q} and observed 24 h later. For each condition, 200 cells, from three independent experiments were counted. Standard error bars are shown. Mann-Whitney statistical analysis was used ($p < 0.0011$). Bars: 20 μm .

Figure 5

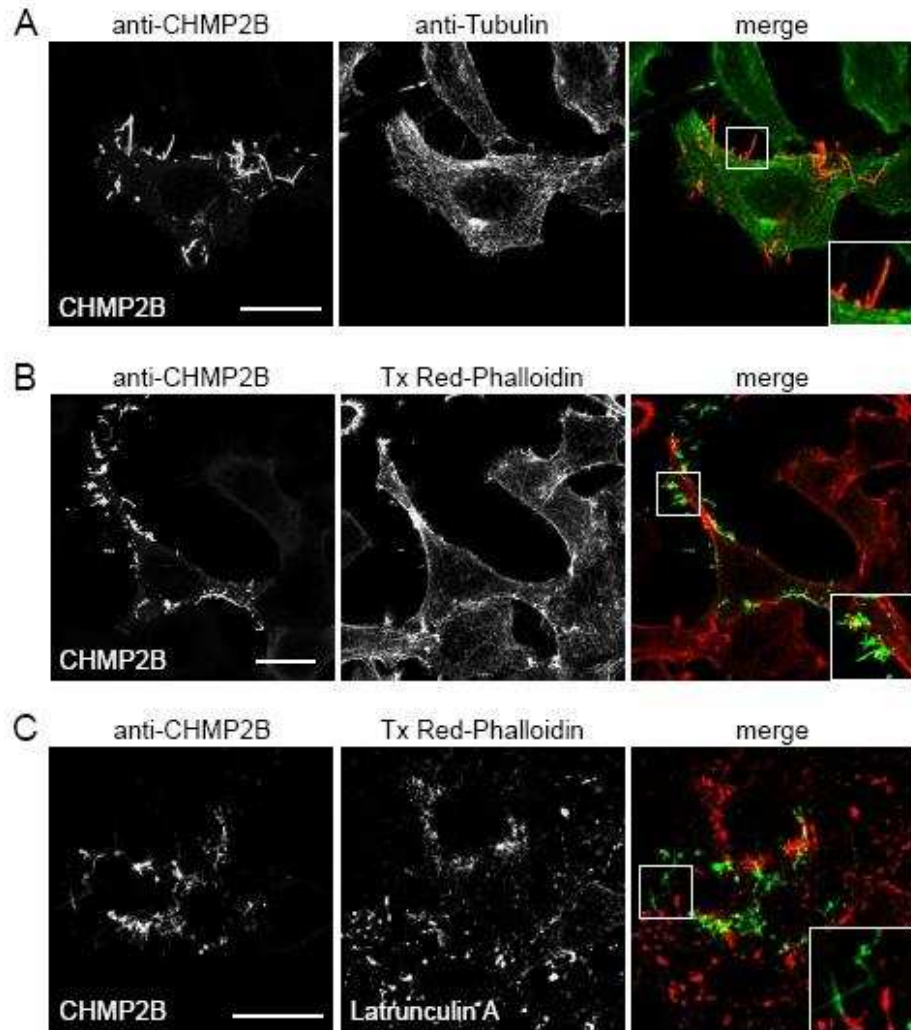


Figure 5: HeLa cells CHMP2B protrusions do not contain actin or tubulin. Immunostaining with anti- β -Tubulin antibody (A) and staining with TexasRed-Phalloidin (B) of HeLa cells overexpressing CHMP2B demonstrate the absence of tubulin and F-actin inside CHMP2B tubes. (C) Latrunculin A treatment (0.1 μ g/mL; 60 min) induces depolymerization of actin but does not collapse CHMP2B tubes.

Figure 6

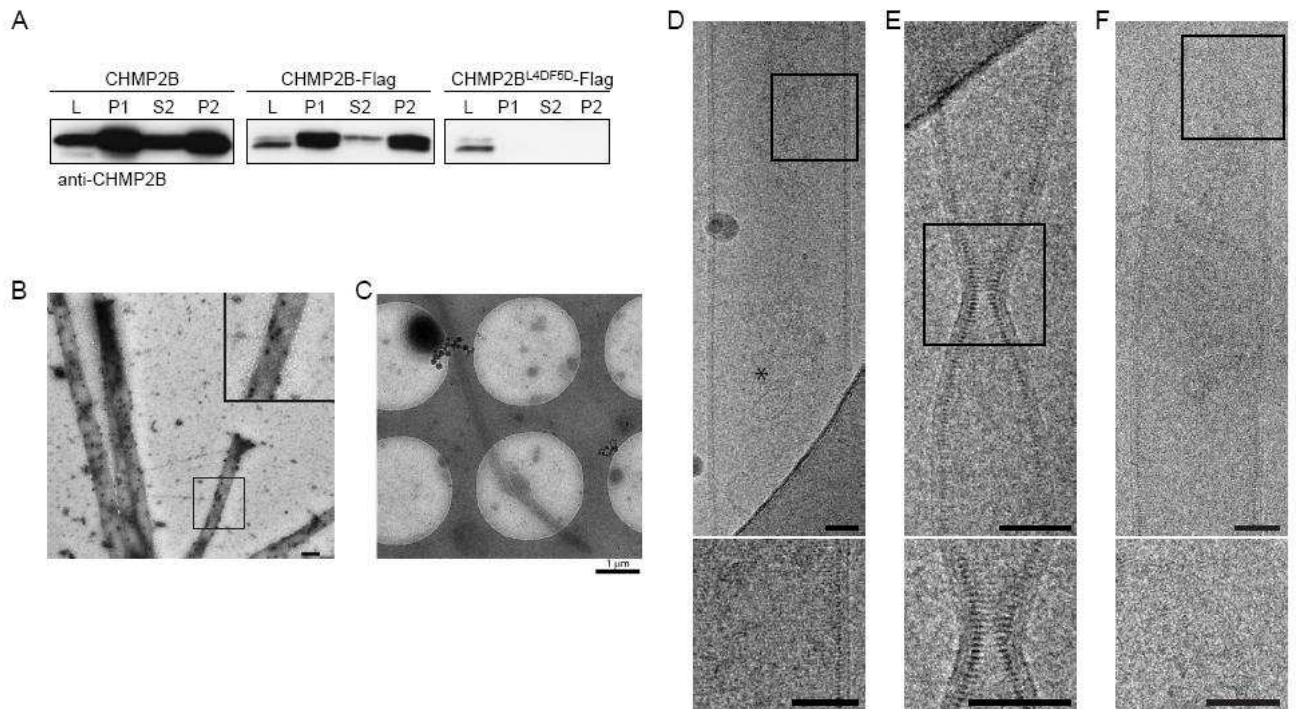


Figure 6: Characterization of tubes pelleted from culture media of CHMP2B expressing cells. (A) Western blotting analysis using anti-CHMP2B of culture media of CHMP2B, CHMP2B-Flag and CHMP2B^{L4DF5D}-Flag expressing cells. L: cell lysates; P1: 30 000 g pellet of culture media. P2, S2: P1 pellets solubilized in 1% Triton X-100 were centrifuged at 20 000 g: most of the CHMP2B-containing material present in culture media is resistant to detergent extraction. No CHMP2B pelletable material could be recovered from media of CHMP2B^{L4DF5D}-Flag expressing cells.

(B) P1 pellets of culture medium of CHMP2B-Flag expressing cells contain tubes made up of CHMP2B. P1 pellets were fixed, permeabilized and immunolabeled with anti-CHMP2B antibodies revealed by protein A gold (10 nm).

(C,D,E,F) Cryo EM analysis of P1 pellets prepared from culture medium from CHMP2B-Flag expressing cells reveals the structure of CHMP2B tubes: (C) Low magnification shows tubes with a length reaching at least 8 μm . (D) Striations perpendicular to the longitudinal axis can be seen across the width of the tube. Asterisk indicates a 50 nm vesicle inside the tube. (E) Constriction of a tube with no change in the helix pitch. (F) Dome closing one end of a tube. The inner leaflet of the membrane is closely associated with the CHMP2B protein lattice. Bars: 50nm.

Figure S1

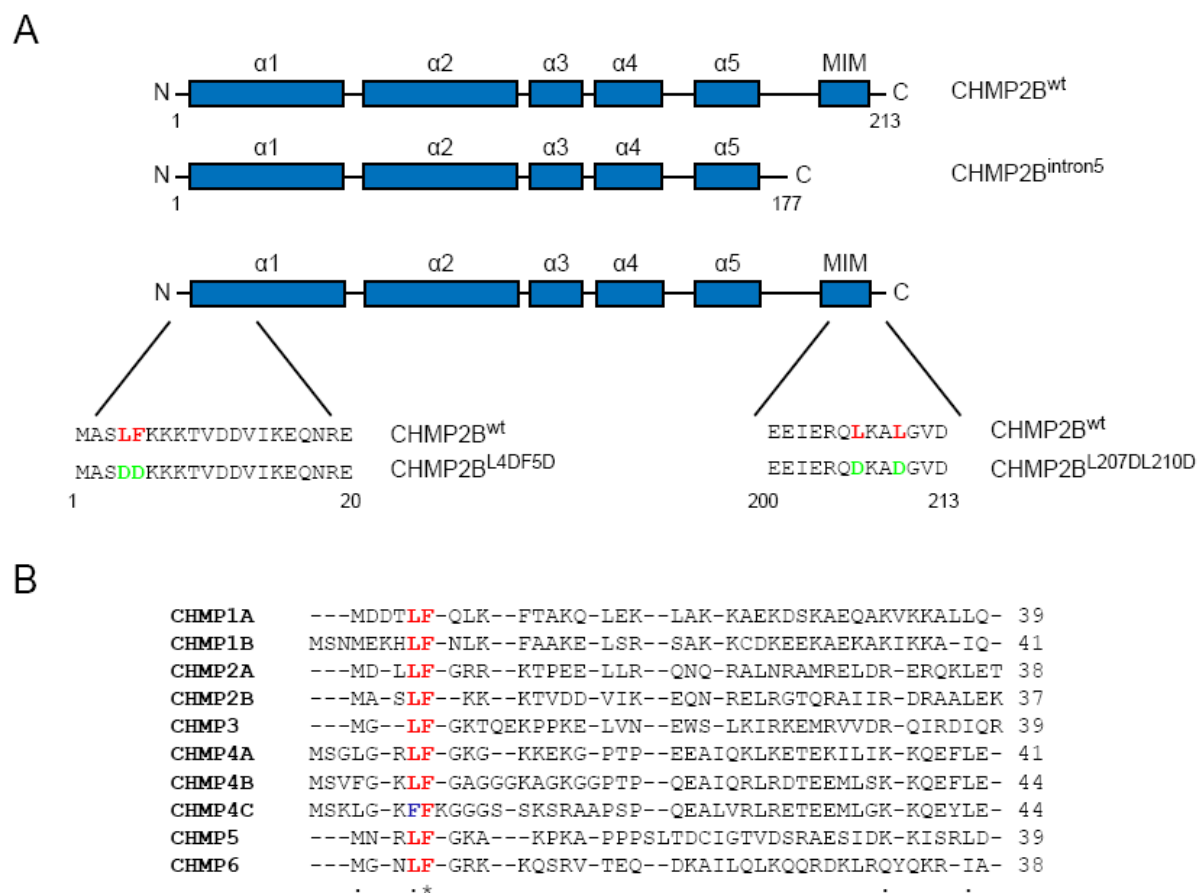


Figure S1: (A) Schematic representation of CHMP2B and CHMP2B mutants used throughout this study. MIM: MIT domain interacting motif. (B) Sequence alignment of the N-terminal amino-acids of human CHMP proteins. Conserved LF residues are shown in bold.

Figure S2

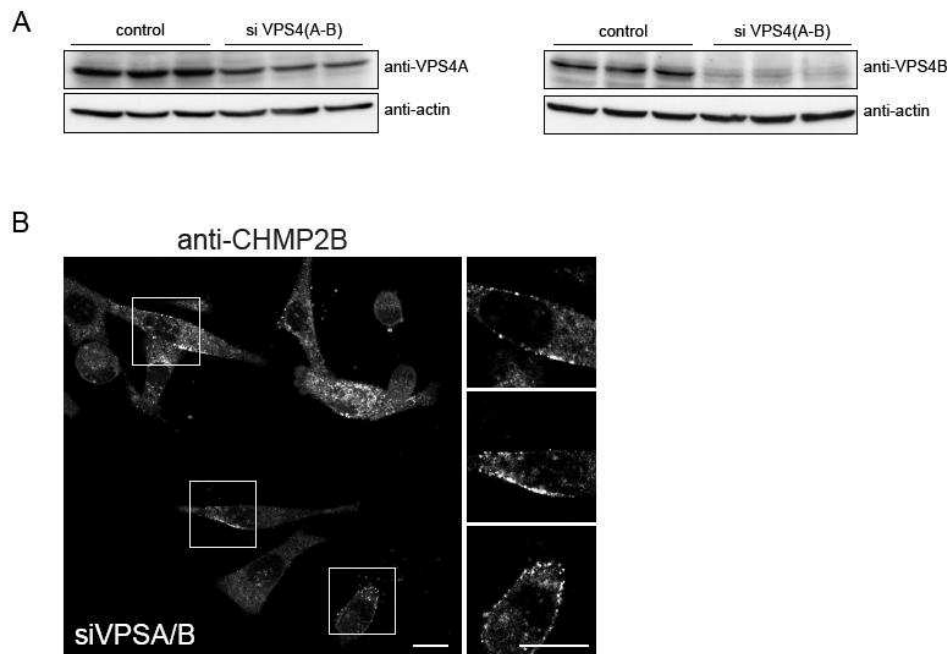


Figure S2: (A) Western-blot analysis of cells used in the experiment shown in figure 1 demonstrates the effect of siRNAs on VPS4A and VPS4B proteins. Lysates of HeLa cells were prepared 72 h after transfection with siRNAs and western-blot revealed using the indicated antibodies. α -Actin was used as loading control. (B) VPS4 and B downregulation induces accumulation of endogeneous CHMP2B at the plasma membrane. Hela cells were depleted of VPS4A and B and immunostained with antibodies against CHM2B as described in Figure 1. The left photograph shows maximum intensity projections. Confocal sections of the boxed areas shown on the right demonstrate the concentration of CHMP2B at the plasma membrane. Bars: 20 μ m.

Figure S3

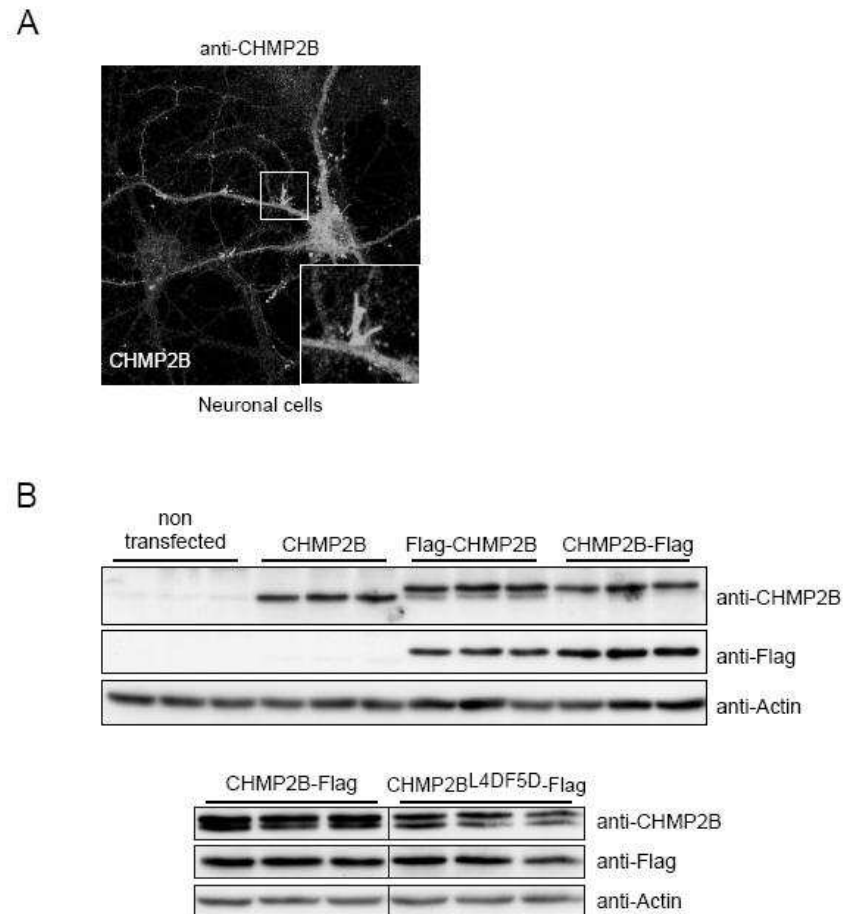


Figure S3: (A) CHMP2B overexpression in post-mitotic neurons induces formation of cell protrusions in which it accumulates. Rat hippocampal neurons (E19) were prepared and transfected with CHMP2B after 14 DIV as described in (39). Three days later, CHMP2B was revealed by immunostaining with a polyclonal antibody against CHMP2B. (B) Western-blot analysis of cells used in the experiment shown in figure 2 reveals comparable levels of expression of all CHMP2B proteins. Lysates of HeLa cells were prepared 36 h after transfection and western blots revealed using the indicated antibodies.

Figure S4

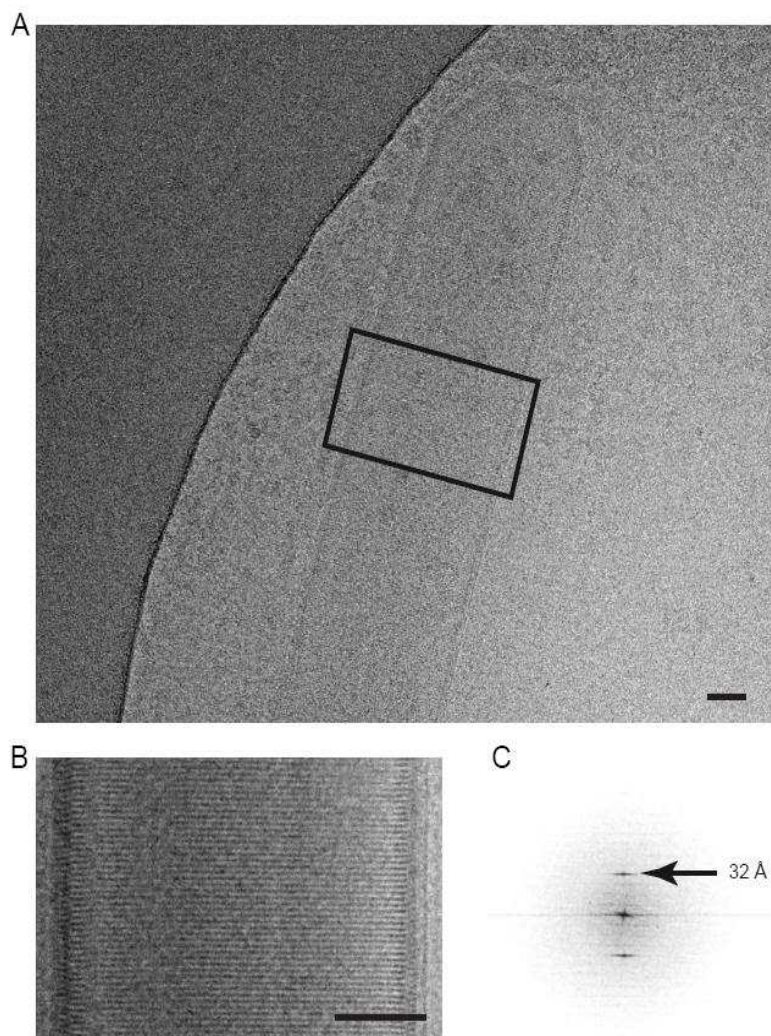


Figure S4: (A) Cryo electron microscopy image of a CHMP2B tube. (B) Part of a 2D average made of 35 boxes (900 x 900 pixels) chosen along the tube shown in A. Bars 50 nm. (C) Power spectrum of the 2D average shown in B. The arrow indicates the layer line corresponding to the $1/32\text{\AA}$ spacing.

Movie S1: 3D reconstruction of a cell expressing CHMP2B immunostained with anti-CHMP2B antibody.

Movie S2: 3D reconstruction of a cell expressing CHMP2B-Flag immunostained with anti-Flag antibody.

CHAPITRE IV – Caractérisation de la protéine CHMP2B in vitro.

1. Contexte de l'étude

Ces travaux s'inscrivent dans le cadre d'une **collaboration** avec l'équipe du **Pr Rémy Sadoul** (GIN, Grenoble). A l'origine, la protéine CHMP2B présentait plusieurs propriétés intéressantes in vivo qui justifiaient son étude in vitro. Gilles Bodon, doctorant au laboratoire, avait alors mis en évidence la présence de CHMP2B dans la fraction mitochondriale de cerveau de rat, au sein de complexes résistants à la protéinase K : **une hypothèse était que CHMP2B puisse être incorporée dans des complexes ESCRT-III associés à la membrane** (Gilles Bodon, <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00594742/fr/>). Cette hypothèse faisait écho à une publication récente de l'équipe (Lata et al., 2008) où l'isoforme CHMP2A chez l'homme pouvait former une structure en dôme avec CHMP3 in vitro. Des modèles avaient notamment été proposés (Lata et al., 2008 ; Fabrikant et al., 2009) où cette structure en dôme pouvait induire un phénomène de scission. Un premier objectif était donc de produire une protéine CHMP2B recombinante et monomérique, susceptible de former des structures similaires à celles observées pour CHMP2A avec CHMP3.

2. Purification et caractérisation de la construction MBP – CHMP2B

La construction MBP-CHMP2B, clonée dans le vecteur pMAL-C2x m'a été aimablement fournie par Agnès Belly. Cette construction de CHMP2B présente une étiquette MBP en n-terminal de la protéine, suivie d'un site de clivage à la protéase TEV. En première intention j'ai appliqué un protocole de purification classique, avec induction sur 3h 30, en présence d'1mM IPTG, puis resuspension du culot bactérien dans un tampon de lyse comme décrit dans la section matériel&méthodes. Après lavage de la résine d'amylose, l'éluion est réalisée en présence de 10 mM Maltose (**voir figure**). La protéine est produite en grandes quantités (environ 30 mg) à partir de seulement 1L de culture. En revanche le rendement de la protéase TEV sur cet échantillon est très mauvais, avec sur gel une estimation de l'ordre

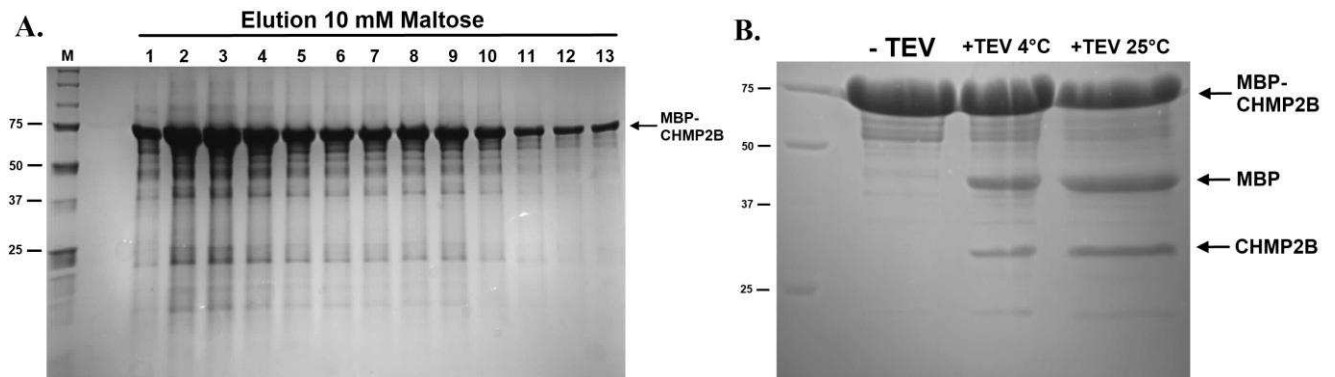


Figure 65 : MBP-CHMP2B est bien exprimé en souche BL21, mais difficilement clivable par la protéase TEV.

A - La construction MBP-CHMP2B élue massivement de la résine d'amylose en présence de 50 mM Tris-Base pH 7.4 ; 0.2 mM NaCl ; 5 mM β meOH.

B - clivage de l'étiquette MBP par la protéase TEV sur la nuit à température ambiante à 4°C.

de 50% pour un temps de réaction d'une dizaine d'heures et à deux températures différentes. L'incubation de la protéase TEV en large excès ne permet pas d'obtenir d'amélioration significative de ce chiffre. La faible efficacité de la TEV peut indiquer l'incapacité de l'enzyme à accéder au site de clivage, **ce qui est souvent un indice d'une protéine agrégée.**

Afin de vérifier l'état d'oligomérisation de l'échantillon partiellement clivé, j'ai contrôlé son profil d'éluion sur une colonne Superdex 200 (GeHealthcare) ; la protéine MBP-CHMP2B élue majoritairement dans le volume mort dans tous les cas testés, à l'exception de l'étiquette MBP. Ce profil est retrouvé pour tous les temps d'incubation testés (1h à 37°C, sur la nuit à 18°C), ainsi que tous les tampons (en présence de KCl, sans sel, avec ou sans détergent). L'analyse en SDS-PAGE de chaque fraction montre toutefois, en présence de 0.1% Triton, des traces de la protéine CHMP2B sous forme non agrégée, mais en quantités faibles. Afin de déterminer si cette construction pourrait former spontanément des polymères en solution, j'ai préparé deux échantillons pour une évaluation par microscopie électronique ; un premier échantillon est purifié par filtration sur gel, et les fractions correspondant au volume mort sont analysées par coloration négative. Les images montrent, de façon reproductible, la présence de longs filaments d'environ 15-20 nm de diamètre, sans périodicité apparente, et présentant pour certains d'entre eux un aspect incurvé. On observe encore très occasionnellement la formation de structures circulaires **d'environ 80-100 nm de diamètre**. L'aspect rugueux de ces polymères peut être attribué à la présence de MBP en N-terminal, qui constitue une protéine globulaire d'environ 42 kDa. Afin d'éliminer un possible biais introduit par le passage en filtration sur gel, la protéine est observée dans un second échantillon directement en sortie de résine Ni-NTA et donne un résultat similaire.

En l'état ces polymères ou agrégats sont donc très stables, même en présence de détergents et de sels, et probablement solubilisés par la MBP. Des homopolymères CHMP4, Vps24 et CHMP2 ont été rapportés dans la littérature. En particulier, des anneaux formés par une construction MBP-CHMP2A 9-222 a été observée au laboratoire ; une différence notable en revanche, est que les structures formées ici par CHMP2B s'assemblent rarement en anneaux fermés, et la forme monomérique n'a jamais été clairement observée non plus avec cette construction, contrairement à CHMP2A.

Une question récurrente à l'étude des polymères ESCRT-III concerne naturellement leur caractère **physiologique** ; ici la présence de la MBP introduit clairement un biais, et l'impossibilité d'obtenir un clivage satisfaisant de ces structures nous a orienté vers une nouvelle stratégie de clonage.

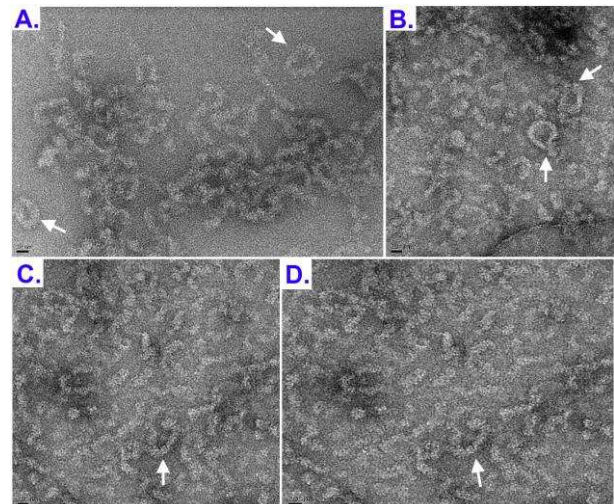


Figure 66 : A-C. Visualisation de polymères MBP-CHMP2B par microscopie électronique en coloration négative. Echelle : 20 nm. Purification sur Superdex200 (volume mort)

D. Polymères/agrégats MBP-CHMP2B purifiés en sortie de colonne Ni-NTA. Les structures circulaires sont marquées d'une flèche blanche.

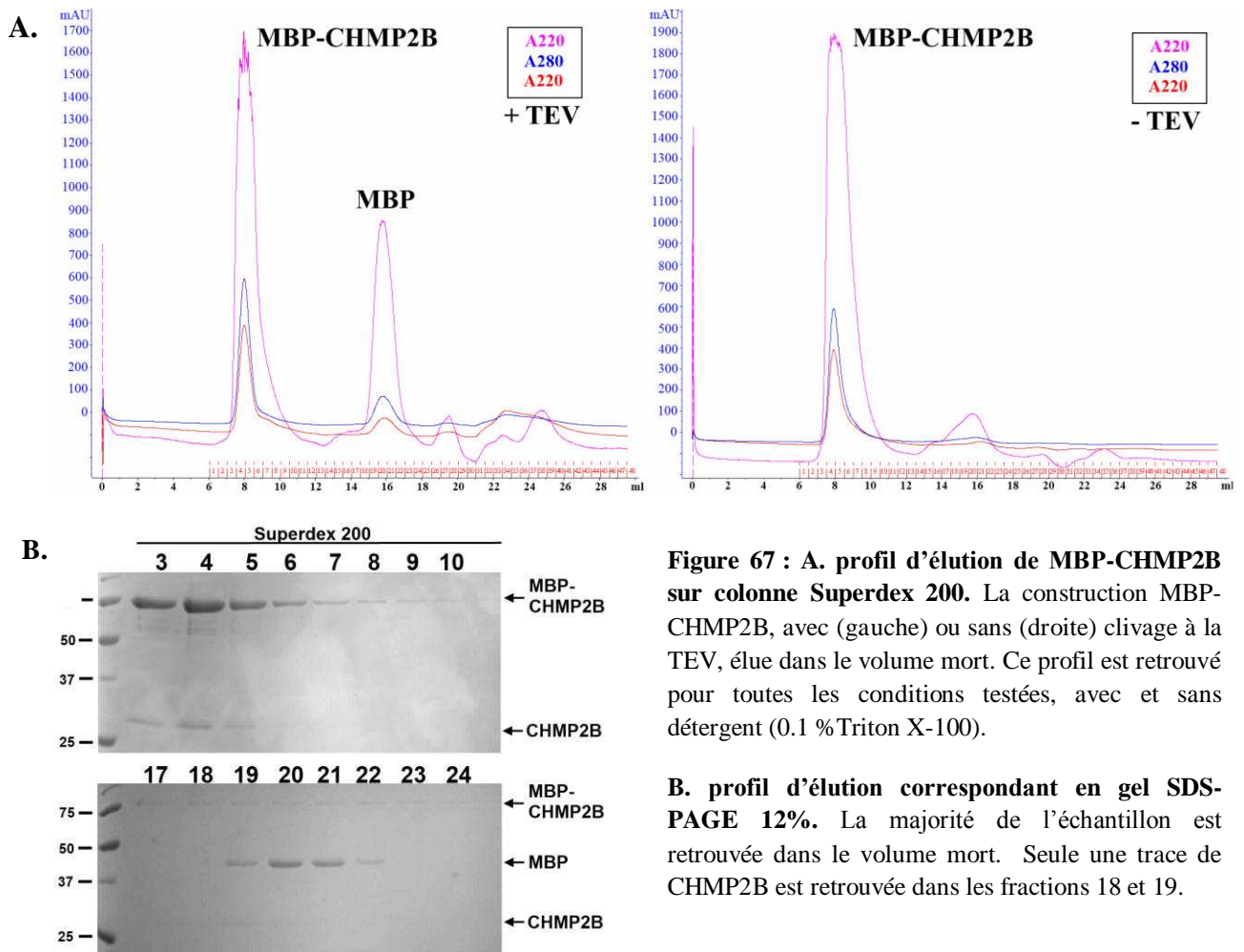


Figure 67 : A. profil d'éluion de MBP-CHMP2B sur colonne Superdex 200. La construction MBP-CHMP2B, avec (gauche) ou sans (droite) clivage à la TEV, élué dans le volume mort. Ce profil est retrouvé pour toutes les conditions testées, avec et sans détergent (0.1 % Triton X-100).

B. profil d'éluion correspondant en gel SDS-PAGE 12%. La majorité de l'échantillon est retrouvée dans le volume mort. Seule une trace de CHMP2B est retrouvée dans les fractions 18 et 19.

3. Purification et caractérisation des constructions CHMP2B – 6xHis.

Parallèlement à ces premières tentatives, Gilles Bodon (GIN, Grenoble) a pu mettre en évidence sur des cellules de mammifères que la surexpression de constructions CHMP2B avec une étiquette en c-terminal induit la formation de protrusions à la surface de la membrane plasmique, contrairement à des constructions étiquetées en n-terminal. **Il a également montré que ces protubérances contenaient la protéine CHMP2B sur toute leur longueur.** Une hypothèse simple est donc que CHMP2B nécessite une extrémité N-terminale intacte pour induire ces structures, et/ou que des étiquettes volumineuses (types MBP) altèrent la stabilité de la protéine. J'ai donc cloné plusieurs constructions de CHMP2B et CHMP2BAC afin de tester cette hypothèse.

La construction CHMP2B-6xHis est exprimée dans le vecteur pET13 en souche BL21 selon les protocoles décrits dans la section matériel & méthodes. Les premiers tests sont réalisés avec un temps

d'induction de 3h, puis resuspension dans un tampon de lyse « classique » (50 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl). Ils mettent en évidence une protéine bien exprimée mais en partie insoluble, éluant précocément sur résine Ni-NTA (Sigma) à 50 mM Imidazole. CHMP2B-6xHis est prédite comme une protéine de 25 kDa, mais elle éluée en gel SDS-PAGE comme une protéine sensiblement plus grande. Cette mobilité aberrante a déjà été observée pour d'autres protéines CHMP, et elle est moins marquée sur les constructions ΔC . En outre, les fractions d'intérêt présentent une forte dégradation de l'échantillon, immédiatement après purification, même en présence d'inhibiteurs de protéases et/ou de PMSF.

Afin de vérifier l'état d'oligomérisation de la protéine, j'ai concentré l'échantillon sur une colonne Vivaspin à 1 mg/ml, puis chargé 0,5 mL sur une colonne S200. La protéine CHMP2B éluée sous forme monomérique, à 15 mL, sans pic observable en volume mort. Par spectrométrie de masse, on identifie dans les fractions composant ce pic au moins cinq espèces : **un premier pic migre à 24841 Da, proche de la valeur attendue (24972) pour la construction CHMP2B-6xHis**. En revanche, quatre pics de plus faible poids moléculaire sont également présents (14074, 13353, 11964 et 9641 Da). Le logiciel Protein Calculator (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>) peut calculer les séquences potentielles d'un fragment, en connaissant la séquence de la protéine complète ainsi que la taille prédite du fragment étudié. L'algorithme propose ici des fragments concernant à la fois la partie n-terminale et la partie c-terminale de CHMP2B.

En S200, la forme complète de la construction migre approximativement au même volume que ces fragments de dégradation ; il est donc possible que la protéolyse spontanée de la construction touche une région flexible, tout en préservant le repliement général de la protéine. En d'autres termes, il est possible que ces fragments puissent interagir entre eux, et qu'ils ne puissent donc pas être séparés efficacement en S200. Par gel SDS-PAGE, les test-expressions de cette construction montrent également de façon minoritaire l'apparition de ces fragments protéolytiques, mais d'une façon moins marquée qu'après élution de la résine : il semble donc que cette protéolyse, **reproductible mais probablement artefactuelle**, soit générée très précocément au moment de la sonication, et qu'elle persiste même en présence d'inhibiteurs de protéases.

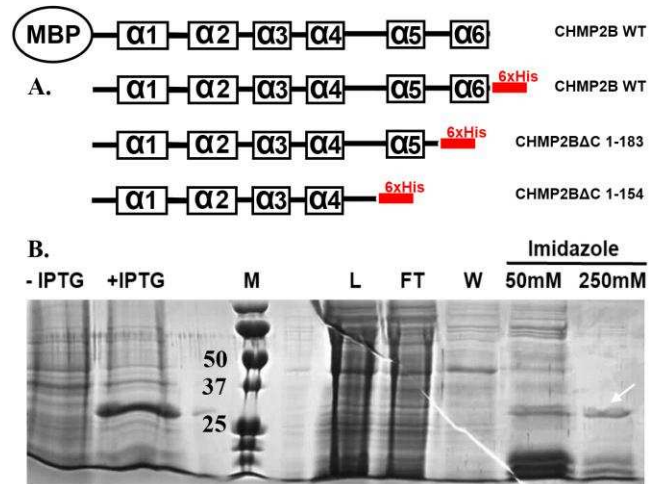


Figure 68: purification de CHMP2B-6xHis

A. Représentation des constructions CHMP2B utilisées pour cette étude.

B. Purification de CHMP2B-6xHis sur colonne de nickel NI-NTA, après induction sur 3h.

Le culot est resuspendu préalablement dans un tampon « low salt » (150mM Imidazole). La protéine éluée massivement dès 50 mM Imidazole et présente des traces de dégradation.

Par ailleurs les rendements obtenus après concentration se sont avérés décevants, compte tenu de l'inadéquation entre la quantité de protéines présentes dans l'échantillon avant injection et le résultat du profil d'élution ; cette variation peut s'expliquer par une aggrégation importante au moment de l'étape de concentration, mais **qui ne s'accompagne pas** de la formation de structures tubulaires observables en microscope électronique, **seulement de polymères linéaires et/ou d'aggrégats amorphes**.

Bajorek et Lata (Bajorek et al., 2008 ; Lata et al., 2008) avaient noté **un effet de la concentration en sel** dans l'état d'oligomérisation des protéines CHMP2A et CHMP3. Afin de limiter cette aggrégation/polymérisation de CHMP2B, j'ai essayé d'optimiser le protocole en modifiant les temps d'induction ainsi que les **propriétés du tampon de lyse**. J'ai notamment repris les culots dans un tampon riche en sel (50 mM Tris pH 7, **1M NaCl, 1M KCl**), et réduit le temps d'induction des bactéries à 1h. De façon surprenante, cette modification légère du protocole a permis **d'augmenter grandement les rendements après colonne Ni-NTA**.

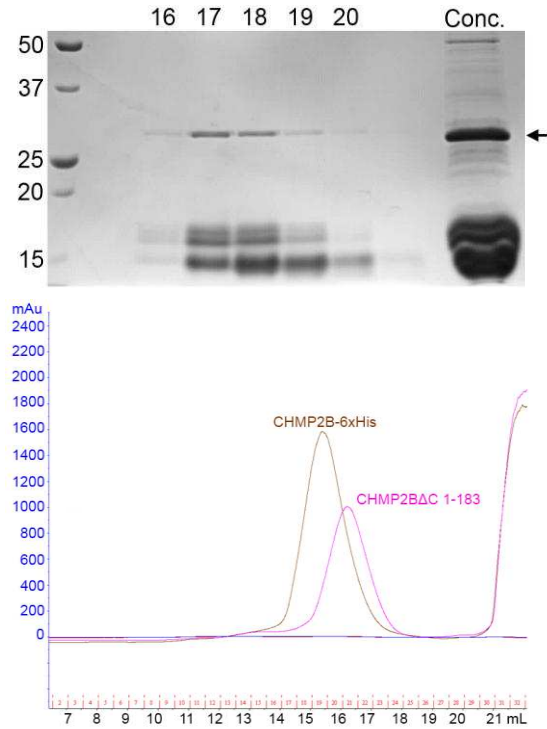


Figure 69: Profil d'élution à 220nm de CHMP2B-6xHis en SDS-PAGE sur colonne Superdex 200

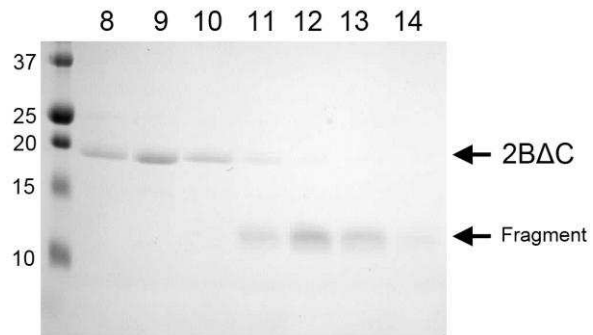
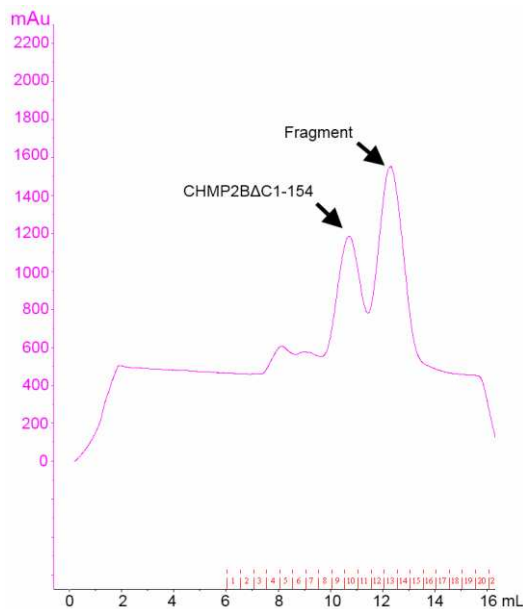


Figure 70 : purification de CHMP2BΔC₁₋₁₅₄ sur colonne S75 et séparation du fragment protéolytique. Suivi à 220nm.

La pureté des fractions est évaluée par gel SDS-PAGE 15%. Le débit de la colonne est fixé à 0.3 ml/minute, afin d'optimiser la résolution des deux espèces en solution.

Bien que la construction CHMP2B Δ C₁₋₁₈₃ donne un pic unique en filtration sur gel, la construction CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ a été préférée pour la caractérisation et la formation de polymères. En effet la seconde construction ne possède pas les hélices α 5 et α 6. Or, selon le modèle proposé par Bajorek, l'hélice α 5 est principalement responsable de l'autoinhibition chez CHMP2, CHMP3 et IST1. Afin d'éliminer un **biais** avec une construction partiellement activée car possédant encore α 5, **nous avons choisi d'utiliser la construction CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄**. La construction CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ éluée de façon **similaire** à la construction CHMP2B Δ C₁₋₁₈₃ sur S75 et S200. Contrairement à la construction CHMP2B, elle ne génère après protéolyse qu'un seul fragment d'environ 13 kDa. La séparation sur colonne de ces fragments n'est en revanche possible qu'en filtration sur colonne S75, les pics étant confondus en S200. Cette séparation est également sensiblement moins marquée pour la forme complète CHMP2B.

Ce protocole permet donc d'obtenir une préparation **monomérique** des constructions CHMP2B. **Toutefois**, les difficultés rencontrées pour concentrer cette construction n'ont pas permis d'envisager sa cristallisation.

4. Interaction de CHMP2B avec des membranes in vitro.

Suite à l'observation de tubulations formées par CHMP2B in vivo, un des enjeux de l'étude était la mise en évidence de polymères CHMP2B en présence de membrane lipidique in vitro. Bien que certaines protéines ESCRT-III soient susceptibles d'interagir directement avec des membranes biologiques, les détails de ces interactions restent à préciser. Les expériences réalisées par Wollert (Wollert et al., 2009 ; 2010) identifient sur les GUVs une interaction directe de Snf7 et Vps20 **dépendante du DOPS**, mais ne testent pas la colocalisation de Vps2 et Vps24. En particulier, aucune donnée ne montre **clairement** une interaction directe de CHMP2A ou CHMP2B avec des lipides. Afin de lever cette ambiguïté, j'ai testé l'interaction des deux constructions CHMP2B et CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ avec des liposomes par flotation. Les liposomes sont de composition simple, **80% SOPC et 20% DOPS**, et sont générés selon le protocole décrit dans la section matériel & méthodes. Dans une première expérience ils sont incubés avec une solution de CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ issue de la purification sur résine Ni-NTA, sans étape de filtration sur gel. L'échantillon est donc composé de la protéine CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ ainsi que du fragment protéolytique. De fait, cet échantillon est ici polydisperse et comprend à la fois la protéine CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ sous forme monomérique et sous forme polymérique. Cette incubation est testée sous deux conditions différentes, à savoir une première

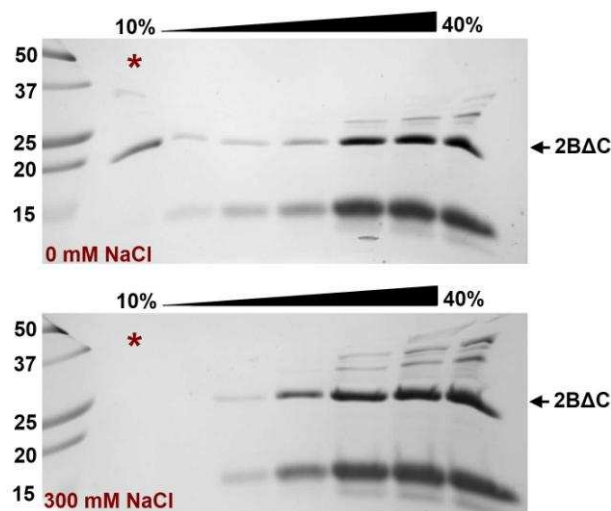


Figure 71 : flotation de CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ en présence de liposomes SOPC 80% /DOPS 20%. Observation par gel SDS-PAGE 15%.

La fraction constituant le haut du gradient est marquée d'une astérisque rouge.

condition où le gradient de sucrose est produit à partir d'une solution tampon riche en sel (300 mM NaCl), et une seconde avec un tampon sans sel (0mM NaCl). Après centrifugation, les différentes fractions constituant le gradient sont récupérées et chargées sur gel SDS-PAGE : si la protéine interagit bien avec les liposomes, elle doit donc « flotter » avec ces derniers, et se retrouver au sommet du gradient. Ici, on retrouve une fraction minoritaire de CHMP2BΔC₁₋₁₅₄ en haut du gradient pour les conditions sans sel uniquement : ce résultat suggère donc la formation d'un complexe entre CHMP2B et le DOPS, probablement de nature électrostatique car dissocié par le sel. Afin de vérifier cette interaction, plusieurs fractions sont observées par microscopie électronique.

Les liposomes SOPC/DOPS, initialement sphérique et d'un diamètre moyen de 200 nm (mesure DLS), flottent en haut du gradient en interagissant avec la protéine CHMP2BΔC₁₋₁₅₄ uniquement; le fragment protéolytique n'est pas retrouvée dans les fractions supérieures, ce qui suggère l'absence d'un motif ou d'une interface critique pour l'interaction. En coloration négative les liposomes montrent une nette diminution de leur diamètre moyen : ici, les liposomes perdent également leur aspect sphérique et semblent en partie consommés par le polymère CHMP2B.

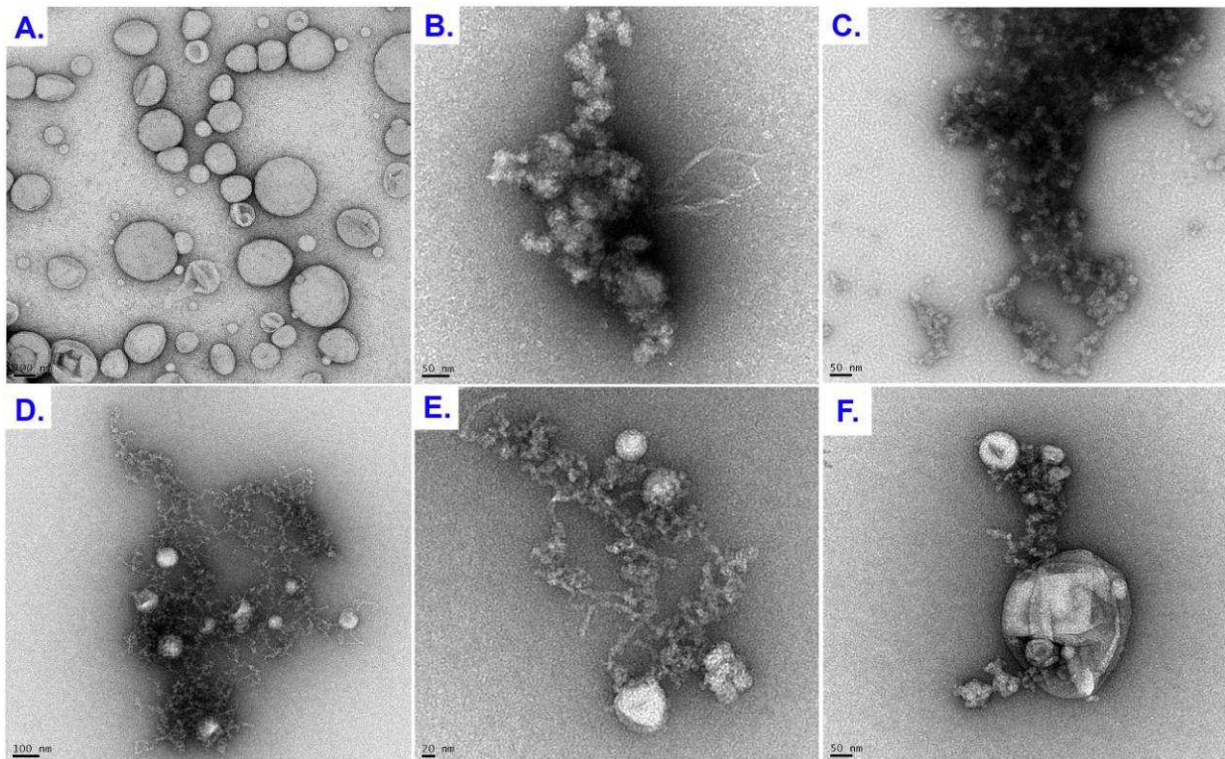


Figure 72 : flotation de CHMP2BΔC₁₋₁₅₄ en présence de liposomes SOPC/DOPS à faible concentration saline. Observations par microscopie électronique, coloration négative.

- A.** Liposomes 80% SOPC / 20% DOPS, diamètre moyen 200 nm.
- B-C.** Clichés représentatifs des fractions basses du gradient. Les polymères/agrégats non fixés aux liposomes restent au fond du gradient.
- D-F.** Clichés représentatifs des fractions hautes du gradient. Les liposomes interagissent avec les polymères CHMP2BΔC₁₋₁₅₄ et présentent un diamètre moyen variable mais fortement réduit.

Afin de déterminer si cette flotation était spécifique de la forme tronquée de CHMP2B, j'ai reproduit l'expérience avec des liposomes de composition similaire, **en présence de la construction CHMP2B et sur un échantillon monomérique, après étape de filtration sur gel.**

Dans ce nouvel échantillon, **et sur des conditions sans sel (0-100 mM NaCl)**, on retrouve une flotation marquée de la forme complète de CHMP2B. L'interaction de CHMP2B avec les liposomes n'est donc propre **ni à la forme tronquée en c-terminal, ni à la forme polymérisée**. Les liposomes observés par EM et correspondant au sommet du gradient ne montrent en revanche pas de diminution significative de leur rayon dans cette seconde expérience. Sur un échantillon monodisperse, l'interaction des protéines CHMP ne s'accompagne donc pas nécessairement de leur polymérisation. En d'autres termes, la capacité de ces protéines à s'associer à la membrane n'est pas strictement corrélée à leur capacité à polymériser et/ou à leur « activation ». Inversement, cette interaction ne conduit pas en soi à leur polymérisation. Ces données suggèrent donc que d'autres déterminants sont à considérer. En particulier le **rayon de courbure** de la membrane lipidique ou la présence de certains partenaires (à identifier) pourraient être des facteurs facilitants (Fyfe et al., 2011) dans la mise en place de ces filaments.

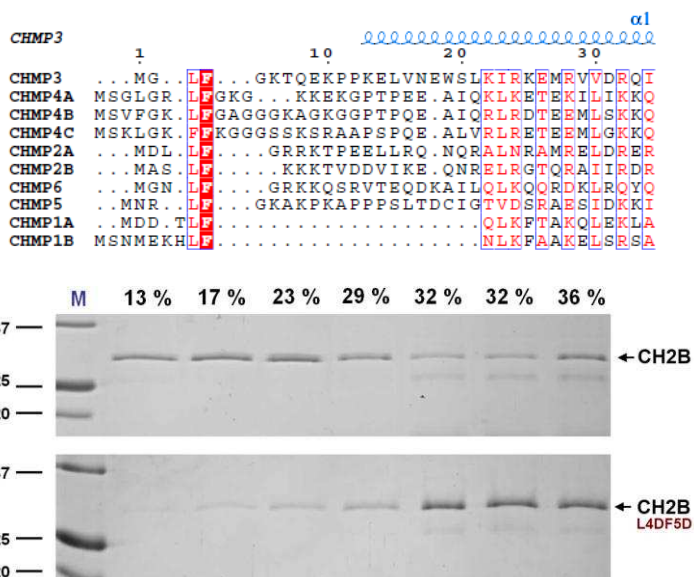


Figure 73 : la mutation d'un motif « LF » en N-terminal de CHMP2B abolit l'interaction avec les liposomes in vitro. Les pourcentages indiqués correspondent au pourcentage de la fraction en sucre, estimée par réfractométrie.

L'interaction de CHMP2B avec des membranes biologiques pourrait être médiée par une interface basique (Muziol et al., 2006). De fait, elle pourrait impliquer plusieurs résidus. Gilles Bodon note toutefois la disparition de ces tubulations après surexpression d'un mutant CHMP2B_{L4DF5D}. On note en effet la présence d'un motif très conservé chez la plupart des protéines CHMP, y compris chez la levure, juste en amont de l'hélice $\alpha 1$: ce motif « LF » ou « FF » dans le cas de CHMP4C, encadré de résidus basiques (Lysine ou Arginine) est prédit comme désordonné. In vitro, le mutant CHMP2B_{L4DF5D} perd sa capacité à interagir avec les liposomes et n'est donc retrouvé qu'au fond du gradient : bien que ce motif ne fasse pas partie du cœur de la protéine, il semble donc jouer un rôle significatif dans le recrutement de la protéine, ce qui pourrait expliquer l'absence de tubulation induite lors de la surexpression du mutant. Notons, par ailleurs, que l'extrémité n-terminale de CHMP6/Vps20 comprend un site de myristoylation à une position similaire (Yorikawa et al., 2005). Bien que CHMP2B soit dépourvu de la séquence consensus, cette région

désordonnée à l'extrémité n-terminale semble donc importante pour la fonction des protéines ESCRT-III en général.

5. Détermination de l'interaction CHMP4B-CHMP2B par SPR

Une de nos premières hypothèses de travail était que les tubulations induites par CHMP2B produisent une structure en dôme comprenant également CHMP3. Dans le cas des polymères CHMP2A-CHMP3 (Lata et al., 2008 ; Bajorek et al., 2009), cette structure peut être produite à partir de constructions partiellement tronquées, dans des tampons à faible concentration en sel, et **en l'absence de membrane**. Dans le cas de CHMP2B **seul**, les polymères sont également produits spontanément sans membrane, ils sont relativement stables mais ils présentent un aspect **filamenteux**, sans structure ni périodicité précise.

Or, **aucun signal** attribuable à CHMP3 n'a été retrouvé au sein de ces protrusions in vivo (Gilles Bodon, communication personnelle), et CHMP2B est la seule protéine ESCRT-III présente dans les tubes. Cette donnée montre donc, contrairement à notre hypothèse initiale, que CHMP3 **n'est pas** impliqué dans le polymère. En effet, le seul signal retrouvé à proximité des protrusions concerne CHMP4A et CHMP4B, qui colocalisent uniquement à la base des tubes, en s'accumulant au niveau de la membrane plasmique. Cette donnée est corroborée par les observations de Hanson (Hanson et al., 2008), qui montrait également un phénomène de tubulation où des polymères CHMP4B s'assemblaient en structures circulaires/spiralées à leur base.

Une nouvelle hypothèse est donc que CHMP4 puisse nucléer l'assemblage de ces structures, et **qu'il existe potentiellement une interaction CHMP4B-CHMP2B, jusque là non documentée, et indépendante de CHMP3.**

A cette même période, une publication de Morita (Morita et al., 2010) montre que le bourgeonnement du HIV est principalement dépendant de CHMP4 et CHMP2, CHMP3 jouant ici un rôle minoritaire. En outre cette équipe montre une interaction **directe** entre CHMP4B et CHMP2A par pulldown. Afin de déterminer si CHMP4B et CHMP2B peuvent également interagir directement, j'ai donc entrepris de mettre en évidence une interaction entre CHMP4B et CHMP2B par **SPR** (Surface Plasmon **R**esonance),

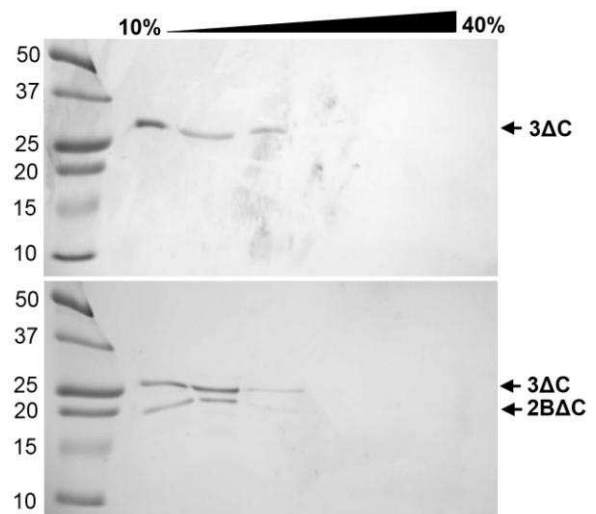
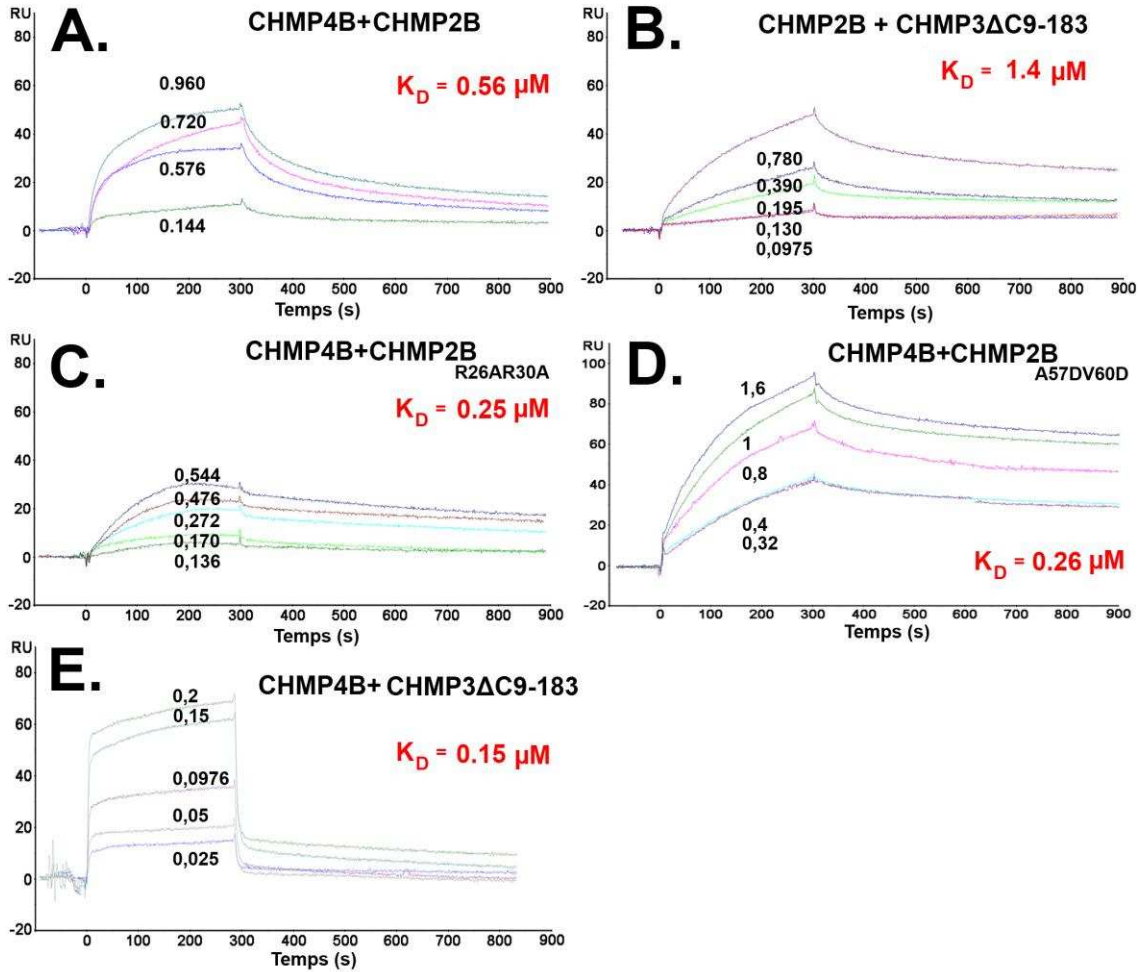


Figure 74 : CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ et CHMP3 Δ C₉₋₁₈₃ ne cosédimentent pas.

Les monomères CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄ et CHMP3 Δ C₉₋₁₈₃ sont incubés de façon équimolaire pendant 1h, puis séparés par gradient de sucrose.

jusque là non rapportée. La construction MBP-CHMP4B Δ C_{Alix} avait été précédemment caractérisée par R. Pires (Pires et al., 2009), et une forme monomérique avait pu être mise en évidence. La construction MBP-CHMP4B formant très majoritairement des filaments (W. Weissenhorn, communication personnelle), nous avons privilégié la construction MBP-CHMP4B Δ C_{Alix} pour l'étude par SPR.

MBP-CHMP4B Δ C_{Alix} est produite à partir d'une chromatographie sur résine Ni-NTA, comme décrit dans la section matériel & méthodes. Après purification du monomère dans une solution riche en sel, l'échantillon est couplé à une puce CM5 sous sa forme non clivée afin de vérifier la présence d'une interaction CHMP4B-CHMP2B. Par SPR, on enregistre une interaction de la forme CHMP2B-6xHis avec une affinité de 0,56 μ M. Cette interaction est donc significative, bien qu'elle soit d'affinité modeste : par comparaison, des interactions CHMP4B-CHMP2A ont été mesurées au laboratoire, sur la même puce et le même modèle expérimental, avec des affinités de l'ordre de 40 nM, soit une valeur 10 fois supérieure (A.Dordor, communication personnelle). De même, une interaction CHMP2B-CHMP3 Δ C₉₋₁₈₃ a été évaluée à 1.4 μ M, ce qui représente le K_d le plus faible de cette série de mesure. Inversement, une interaction CHMP4B-CHMP3 Δ C₉₋₁₈₃ a été mesurée à 0.15 μ M, soit une valeur dix fois supérieure.



Analyte	Ligand	k_a ($10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	k_d (10^{-3} s^{-1})	K_D (μM)	χ^2
CHMP2B	CHMP4B	6.9 ± 0.18	3.9 ± 0.056	0.56	1.43
CHMP2B _{R26AR30A}	CHMP4B	7.5 ± 0.26	1.9 ± 0.073	0.25	1.26
CHMP2B _{A57DV60D}	CHMP4B	6.6 ± 0.033	1.7 ± 0.023	0.26	0.726
CHMP3 ΔC_{9-183}	CHMP4B	15 ± 0.83	2.2 ± 0.010	0.15	0.365
CHMP3 ΔC_{9-183}	CHMP2B	1.9 ± 0.074	2.6 ± 0.041	1.4	0.381

Figure 75 : analyse par SPR des interactions CHMP4B-CHMP2B. Les constantes cinétiques sont indiquées dans le tableau ci-joint.

A-C-D. La construction MBP-CHMP4B ΔC_{Alix} est fixée sur la puce CM5 (500 RU). Les protéines utilisées comme analyte sont indiquées en gras.

B. La construction CHMP2B est fixée sur la puce CM5 (600 RU).

Il semble que, dans ce contexte, l'interaction CHMP4B-CHMP2B soit plus favorable qu'une interaction CHMP3-CHMP2B, et qu'elle soit dans l'ordre de grandeur d'un complexe transitoire. En comparaison, la faible affinité de CHMP2B pour CHMP3 pourrait expliquer l'incapacité à obtenir *in vitro* un complexe avec ces partenaires. En revanche, compte tenu de l'absence de cet isoforme dans les protrusions, le rôle de CHMP4 à la base des tubes est d'autant plus difficile à expliquer par ces seules données. Le papier de Morita montre en outre un mutant CHMP2A_{R24R27R31} incapable d'interagir par pulldown : afin de déterminer si cette interface est également importante pour l'interaction CHMP4B-CHMP2B, un mutant CHMP2B_{R26AR30A} a été construit et testé sur la puce CM5. Un second mutant CHMP2B_{A57DV60D}, qui ne produit plus de protrusions après surexpression, a également été testé. La différence de K_d entre les formes sauvage et mutantes de CHMP4B est d'un facteur 2 : cette différence pourrait être seulement due **aux imprécisions** liées à la détermination de la concentration de l'échantillon CHMP2B, et ne reflète pas, de façon significative, une modification de l'affinité chez le mutant.

Globalement ces deux analyses ne montrent donc pas de perte **significative** d'affinité en SPR par rapport à la protéine native, ce qui suggère que les résidus testés ne sont pas ou peu impliqués dans l'interaction. Alternativement, l'absence de protrusions chez les mutants CHMP2B pourrait être liée à d'autres paramètres que le recrutement de CHMP4B à la base des tubes, par exemple un défaut dans l'interaction avec la membrane plasmique ou d'autres partenaires cellulaires, ou encore une déstabilisation du polymère lui-même. Il faut en particulier noter que le mutant CHMP2B_{R26AR30A} n'est pas strictement équivalent au mutant proposé par Morita (Morita et al., 2010), qui était un mutant CHMP2A_{R24AR27AR31A}.

6. Purification et Caractérisation de la protéine CHMP4B-6xHis

Afin de déterminer si CHMP4B et CHMP2B peuvent former ensemble un polymère, j'ai entrepris de purifier CHMP4B sous sa forme monomérique. Comme vu précédemment, la construction MBP-CHMP4B, initialement clonée par R. Pires, forme exclusivement du polymère (W. Weissenhorn, R. Pires, communication personnelle). En outre, l'interaction de CHMP2B avec la membrane et l'absence de protrusions *in vivo* avec des constructions étiquetées en N-terminal suggèrent que ces protéines nécessitent que cette extrémité soit libre pour exercer leur fonction, ce qui n'est pas le cas pour MBP-CHMP4B et MBP-CHMP4B Δ C_{Alix}. **Afin de contourner ce problème potentiel**, j'ai donc utilisé (comme pour CHMP2B) une construction CHMP4B clonée dans le vecteur d'expression pETM13. Cette construction présente seulement une étiquette histidine en c-terminal non clivable (LEHHHHHH). En revanche la protéine est faiblement exprimée et élue précocément de la colonne de Nickel, ce qui comme pour CHMP2B complique sa purification. En jouant sur les conditions d'élution, je suis parvenu à obtenir un échantillon relativement pur de la protéine, qui a été ensuite identifiée par western blot à partir d'anticorps primaires anti-CHMP4B (aimablement fournis par Gilles Bodon). La protéine migre en SDS-PAGE vers le marqueur de poids moléculaire à 37 kDa, ce qui est bien supérieur à la taille attendue de 26 kDa (voir figure 76). Ce phénomène **de migration aberrante**, également observé pour CHMP2B, est ici particulièrement marqué. A titre de comparaison, l'homologue de CHMP4B chez la drosophile (Shrub), migre à une taille similaire (données non montrées).

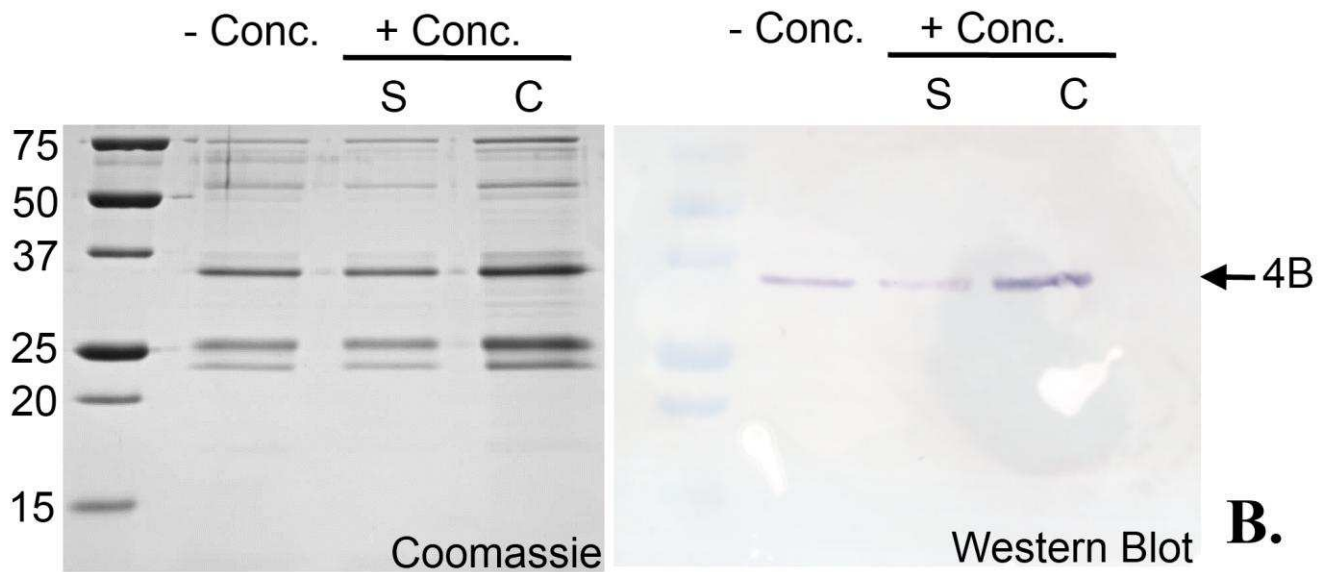
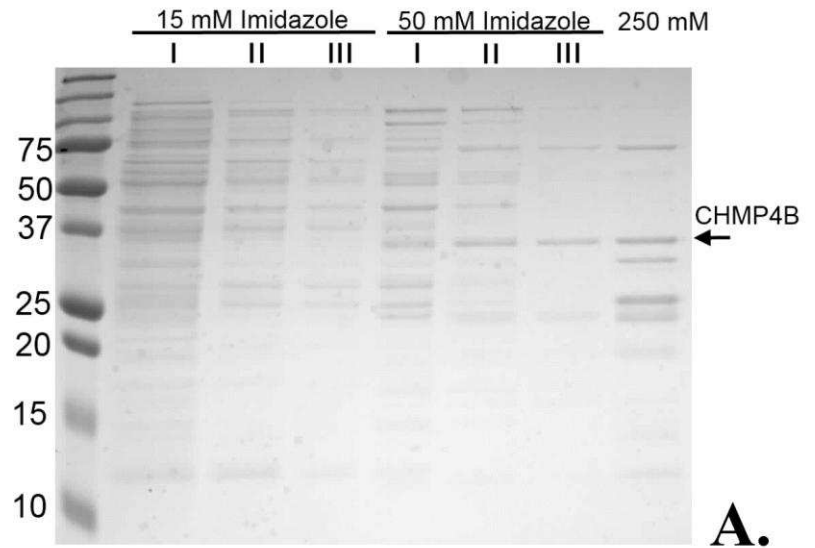
En essayant de concentrer cet échantillon, j'ai réalisé qu'une partie sédimentait au fond du tube au moment de l'étape de concentration, d'une façon similaire à ce que j'avais pu observer pour CHMP2B.

L'observation de cet échantillon par microscopie électronique montre en effet la présence de structures d'environ 80 nm de diamètre, majoritairement interrompues en leur centre pour laisser paraître un orifice moyen d'une dizaine de nanomètres.

Figure 76 : CHMP4B-6xHis est faiblement exprimée et s'aggrège après concentration.

A. Profil d'élution de CHMP4B-6xHis sur colonne Ni-NTA

B. CHMP4 est identifié sur Western Blot, à partir d'un anticorps anti-CHMP4 et aggrège après concentration, comme le montre la baisse d'intensité du signal entre la partie soluble (S) et le culot (C) après centrifugation.



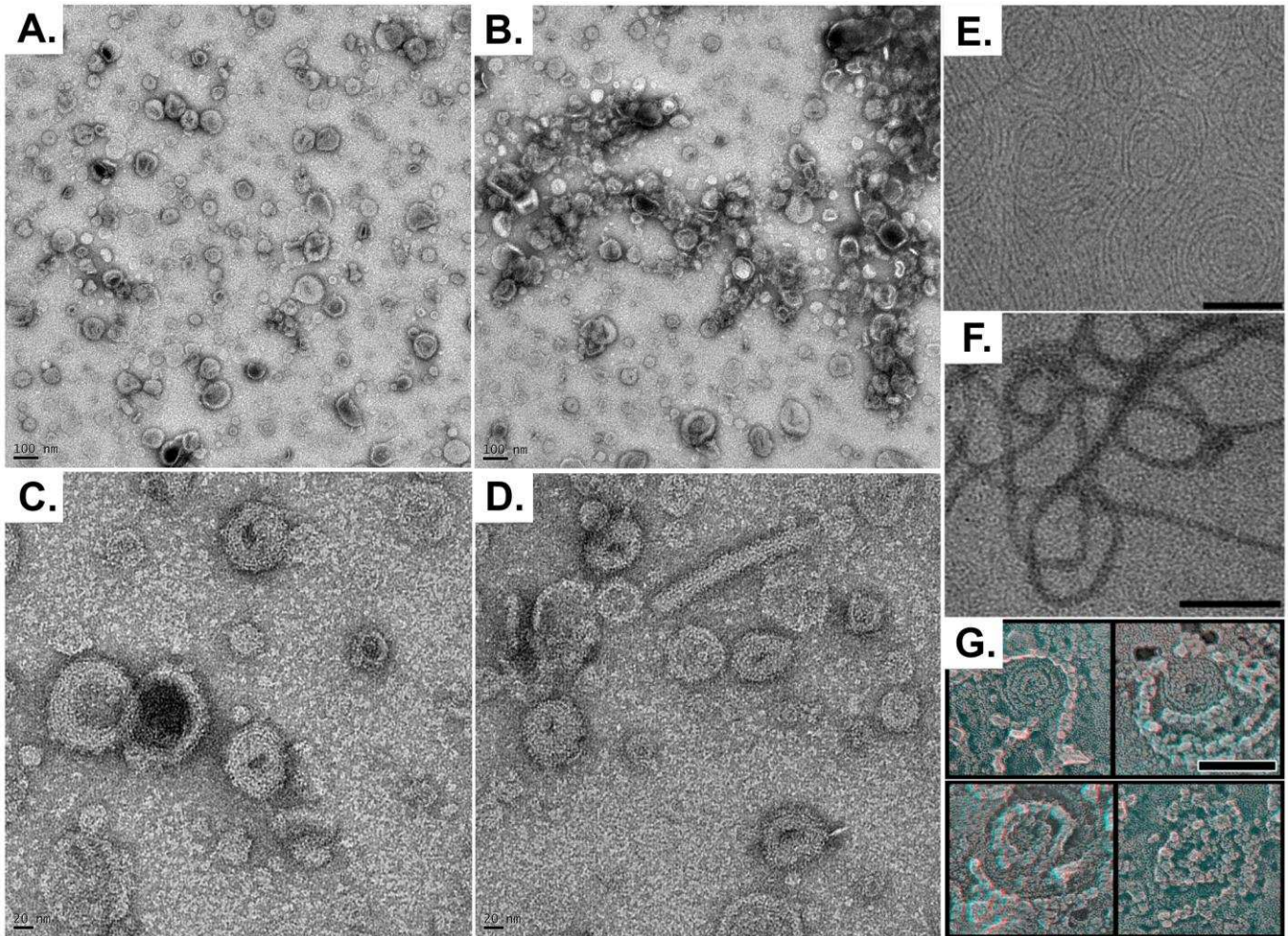


Figure 77: L'observation des polymères CHMP4B-6xHis *in vitro* par microscopie électronique montre une ressemblance frappante avec les polymères CHMP4B produits *in vivo* par Hanson.

A-D : l'échantillon CHMP4B concentré décrit dans la figure 76 est visualisé par coloration négative en microscopie électronique et montre des structures potentiellement spiralées.

E : CHMP4B Δ C_{Alix} visualisé par cryo-EM (Pires et al., 2009). Echelle 100 nm.

F : CHMP4B Δ C_{Alix} visualisé par coloration négative (Pires et al., 2009). Echelle 100 nm.

G : CHMP4B endogène visualisé par coloration négative (Hanson et al., 2008), sur des membranes de cellules HEK293, exprimant un mutant VPS4 déficient en hydrolyse. Notez l'accumulation de VPS4 en périphérie. Echelle 100 nm.

Hanson (Hanson et al., 2008) avait mis en évidence des **structures** très similaires en surexprimant la protéine CHMP4B dans des cellules COS-7 et HEK293. Dans un cas, ces structures pouvaient être induites par la surexpression d'un mutant VPS4 déficient en hydrolyse. L'obtention de structures identiques à partir d'une protéine recombinante suggère donc que l'aspect circulaire décrit par Hanson est une caractéristique **intrinsèque** des filaments CHMP4 et **qu'elle n'est pas dépendante de VPS4 in vitro**, la machinerie ESCRT étant absente chez E.Coli.

Une autre remarque concerne la **différence de morphologie évidente** entre ces structures et les filaments décrits par R.Pires sur les constructions MBP-CHMP4B et MBP-CHMP4B Δ C_{Alix}. Il est donc possible que, dans ce second cas, la présence de MBP à l'extrémité n-terminale des constructions ait introduit des contraintes dans le mode de polymérisation : bien que des spirales aient également été décrites avec ces constructions (quoique moins compactes en apparence), il est donc possible que la forme filamenteuse soit en partie artefactuelle. A une exception près (voir figure 77-D), cette forme filamenteuse et/ou allongée n'a pas été clairement observée sur la construction CHMP4B-6xHis.

Naturellement, une seconde hypothèse est que la protéine CHMP4B puisse polymériser sous plusieurs formes, correspondant chacune à un mode d'activation différent ; **les fonctions biologiques de tels polymères alternatifs sont en revanche très incertaines**. La présence ou non de membranes biologiques à proximité pourrait également jouer un rôle dans le diamètre et/ou l'aspect général de ces polymères.

7. Orientation future du projet : le système GUV (collaboration P. Bassereau)

Bien qu'un mutant CHMP2B ait été impliqué dans une maladie neurodégénérative humaine, la nature physiologique des tubulations induites par CHMP2B n'est pas établie. En revanche, cette étude souligne une propriété particulière de cette protéine à polymériser directement au niveau de la membrane plasmique. Les approches qui ont été menées dans ce présent chapitre ne peuvent en revanche considérer ce remodelage que d'un point de vue **statique**. A ce titre, les expériences de sédimentation ont été réalisées en l'absence de membranes (type liposome). Bien que les polymères CHMP2A-CHMP3 aient été obtenus également en l'absence de membranes, l'environnement lipidique pourrait avoir un rôle de stabilisation dans ce processus. Or, un intérêt majeur des vésicules unilamellaires géantes (GUVs) est la possibilité de suivre **en temps réel** (donc de façon dynamique), avec un microscope confocal, la fluorescence émise de protéines marquées ainsi que leur activité de remodelage (Wollert et al., 2009 ; 2010). Ce dernier aspect ne peut donc pas être facilement appréhendé avec des expériences de flotation et/ou de sédimentation. Par ailleurs, les expériences déjà entreprises sur les GUVs ne nécessitent que des solutions diluées de protéines ESCRT, de l'ordre de la dizaine de nM.

Afin d'utiliser ce système expérimental, nous avons démarré dans les derniers mois de mon doctorat une collaboration avec **Patricia Bassereau (Institut Curie)**. Un pré-requis pour cette étude concerne l'obtention de protéine monomérique et marquée par un fluorophore de type Alexa 488-C5 maleimide (Invitrogen). Ce composé peut interagir spécifiquement et former un complexe stable avec des cystéines libres. CHMP4B ne possède aucune cystéine native, tandis que CHMP2B contient une cystéine au niveau de son hélice α 2 et prédite comme non accessible au solvant sur la base de la structure de CHMP3 (Bajorek et al., 2009). J'ai donc modifié l'étiquette c-terminale de ces constructions (originellement

LEHHHHHH), par CLEHHHHHHH. Le protocole de purification de CHMP2BAC ayant permis d'obtenir une quantité de matériel compatible avec un marquage Alexa, et la protéine CHMP2B supportant difficilement toute étape de concentration, j'ai donc choisi d'incuber cette protéine directement en sortie de résine Ni-NTA, en l'absence d'agent réducteur, puis de séparer la fluorescence libre de la protéine marquée en passant l'échantillon sur colonne S75.

La protéine CHMP2BAC_{Cys} élue en filtration sur gel aux mêmes fractions que la forme initialement caractérisée. Le spectre de fluorescence permet d'estimer un rendement de marquage entre 70 et 95%, soit une molécule d'Alexa488 en moyenne par protéine. La protéine CHMP2BAC_{Cys} ne pose aucun problème majeur de stabilité et semble donc pouvoir être marquée efficacement. J'ai également essayé de reproduire le protocole de purification de CHMP2B-6xHis pour la construction CHMP4B_{Cys} **mais sans succès**. Pour une raison que j'ignore, l'ajout d'une cystéine en c-terminal semble **diminuer grandement** la quantité de protéines éluant en sortie de colonne de nickel. CHMP4B éluant précocément dès l'étape de lavage à 50 mM Imidazole, il est de fait difficile de l'obtenir en quantités suffisantes et assez pure pour envisager le marquage par Alexa 488 directement: ce comportement pourrait être lié à la capacité accrue de CHMP4B à polymériser, et de fait à former en l'absence d'agent réducteur des ponts disulfures en solution. De fait, je n'ai pu obtenir que des quantités faibles de CHMP4B monomérique avec la construction CHMP4B-6xHis. En l'état, ce protocole devra donc être revu pour inclure CHMP4B marquée dans ces expériences

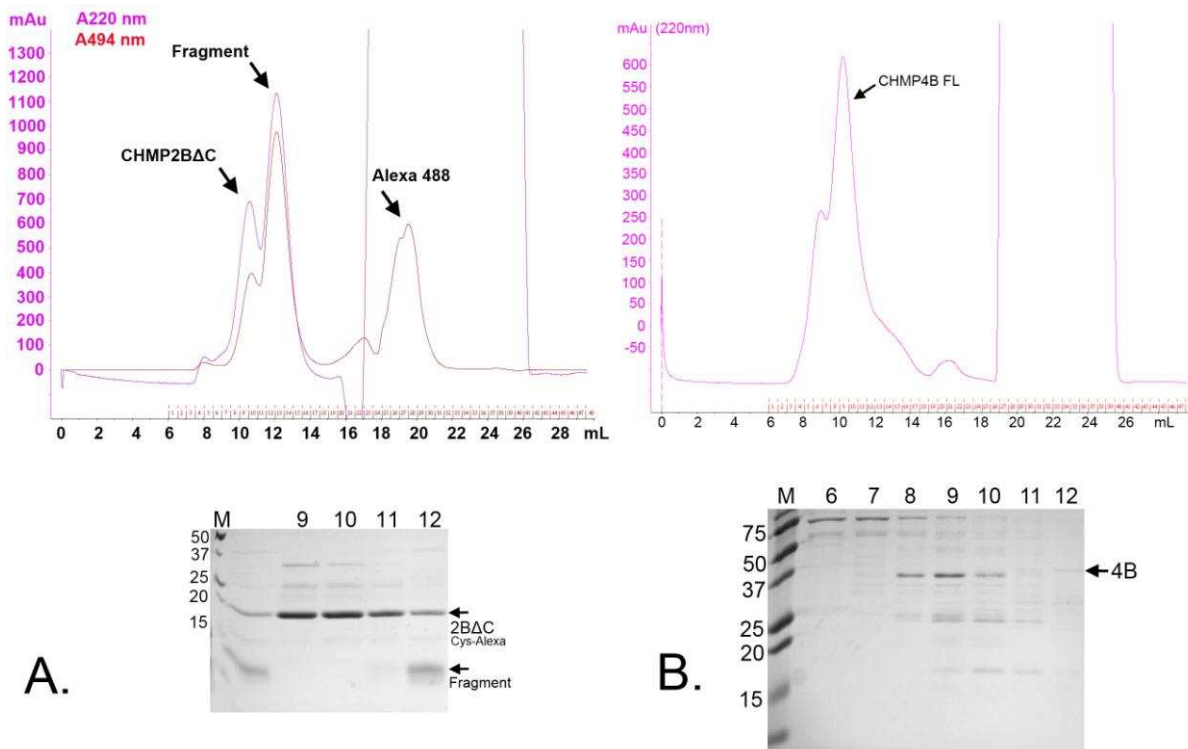


Figure 78: préparation des échantillons pour les expériences GUVs.

- A. Séparation de la protéine CHMP2BAC et du marqueur Alexa 488 sur colonne Superdex 75. Le gel SDS-Page correspondant aux pics d'intérêt figure en dessous.
- B. Purification de CHMP4B soluble non marquée sur colonne S75. Le gel SDS-Page correspondant aux pics d'intérêt figure également en dessous.

8. Discussion

8.1 Un modèle simplifié de polymérisation de CHMP2B

Les polymères CHMP4B formés *in vitro* (cette étude, voir également Pires et al., 2009) ne présentent pas la structure en dôme décrite pour les polymères CHMP2A-CHMP3 (Lata et al., 2008 ; Bajorek et al., 2009). En outre, les données SPR permettent ici de confirmer l'hypothèse selon laquelle **CHMP4B et CHMP2B interagissent directement**, avec une affinité de l'ordre du microolaire.

Cette différence est donc cohérente avec l'observation exclusive de CHMP2B dans les protubérances induites au niveau de la membrane plasmique (Bodon et al., 2011). L'absence des protéines CHMP2A et CHMP3 au sein de ces protrusions est en revanche plus surprenante, compte tenu des similitudes entre ces structures et les polymères CHMP2A-CHMP3. Il est donc possible que ces deux structures, bien que semblables, soient impliquées dans des processus différents, et donc que leur activation et/ou leur recrutement à la membrane plasmique soit ici limité.

Toutefois, l'aspect des polymères CHMP4B recombinants obtenus dans cette étude est très proche des structures identifiées par Hanson (Hanson et al., 2008) en cellules de mammifères. Cette donnée ouvre donc la possibilité **que CHMP2B soit également impliquée dans le phénomène rapporté par Hanson au niveau de la membrane plasmique** : en particulier, cette équipe avait déjà observé en microscopie électronique de telles structures induites par la surexpression des isoformes CHMP4A et CHMP4B. Les auteurs montraient également la formation de structures circulaires et/ou en spirales attribuables à CHMP4B, à la base de ces protrusions. Le contenu de ces protrusions, en revanche, n'avait pas été clairement identifié. La présente étude ouvre donc la possibilité qu'elles aient été formées par le polymère CHMP2B lui-même.

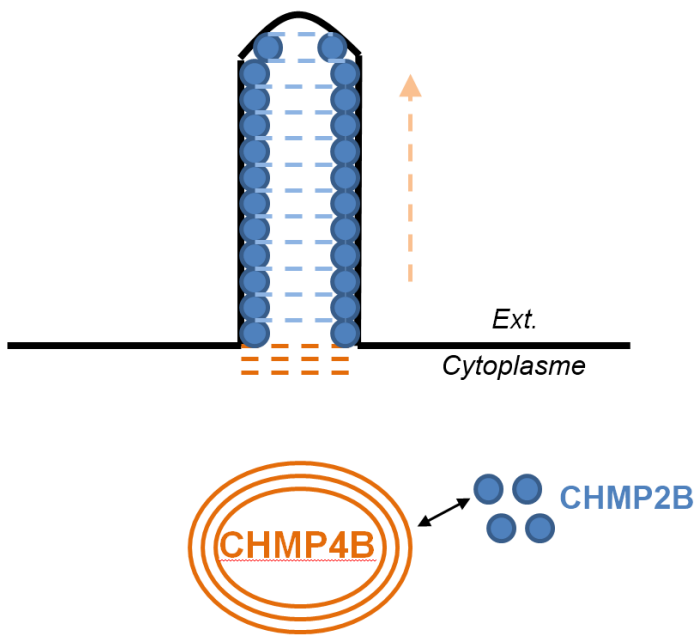


Figure 79: schéma d'interprétation des polymères CHMP2B

Selon ce modèle, CHMP4B s'assemble directement en anneaux ou en spirales au niveau de la membrane plasmique après surexpression.

L'interaction directe entre CHMP4B et CHMP2B induit le recrutement de CHMP2B au point de bourgeonnement.

CHMP2B est stabilisé sur la membrane plasmique par son extrémité N-terminale et induit la protrusion par polymérisation.

Une différence notable avec le protocole expérimental d'Hanson réside toutefois dans le fait qu'aucune protrusion n'est visible ici après surexpression des constructions CHMP4A-Flag ou CHMP4B-Flag : en ce sens, le phénomène induit par CHMP2B ne semble pas ici strictement comparable avec celui observé par Hanson. Une explication pourrait résider dans le fait que les constructions surexprimées par Hanson présentaient une étiquette FLAG en N-terminal : en l'état cet effet positionnel de l'étiquette FLAG suggère donc un rôle particulier **de l'extrémité N-terminale de CHMP4B et CHMP2B**.

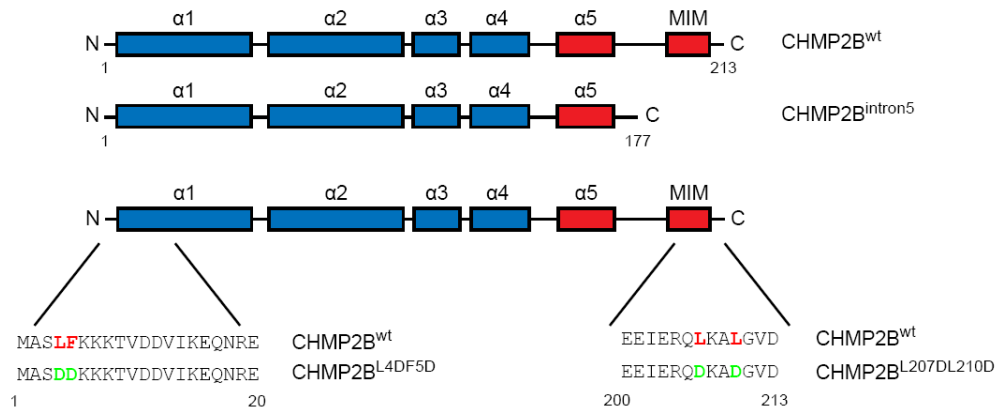


Figure 80: récapitulatif des différentes constructions utilisées pour l'étude in vivo (tiré de Bodon et al., 2011)

8.2 Interaction de CHMP2B avec la membrane

Un autre point abordé dans cette étude concerne l'interaction **directe** de CHMP2B avec la **membrane plasmique**. Sur le plan biochimique, l'interaction identifiée in vitro sur des liposomes est la première rapportée, à ma connaissance par une technique de flotation. Il s'agit donc d'une **interaction stable**, probablement d'origine **électrostatique** car réalisée en présence de DOPS et abolie en présence de sels. Ces interactions sont dépendantes de la partie N-terminale basique de la protéine, et on retrouve ici ce phénomène particulier avec une flotation marquée de la protéine CHMP2B Δ C₁₋₁₅₄. En outre cette flotation n'est pas liée à l'état oligomérique et/ou « activé » de la protéine, puisqu'elle est retrouvée à la fois sur des échantillons monomériques et filamenteux.

Cette interaction n'a pas été quantifiée précisément, et sa spécificité reste également à déterminer ; en particulier, il serait intéressant de déterminer si cette interaction est spécifique de la phosphatidylsérine ou si elle peut concerner d'autres lipides. En l'état, il est en revanche probable que cette propriété soit partagée avec CHMP2A compte tenu de la bonne homologie de séquence entre les deux isoformes.

L'importance d'un motif hydrophobe LF en N-terminal retrouvé chez la plupart des protéines CHMP suggère un mode d'interaction conservé. Cette extrémité avait déjà été impliquée pour CHMP6 (Yorikawa et al., 2006), CHMP3 (Whitley et al., 2003) et CHMP4 (Lin et al., 2005). Dans le cas de CHMP6, cette interaction est **dépendante de la myristoylation** de la protéine. Dans les cas de CHMP3 et CHMP4, les auteurs notent une spécificité respective pour le PtdIns(3,5)P₂ et le PtdIns3P.

En l'état, les bases moléculaires de cette interaction ne sont donc pas définies clairement. Des motifs « LF » sont en particulier retrouvés dans de nombreuses hélices amphipathiques impliquées dans des phénomènes de remodelage membranaire, y compris dernièrement chez E.Coli (Salje et al., 2011 ; Shih et al., 2011). Bien que la région N-terminale de CHMP2B soit distincte de l'hélice $\alpha 1$ et prédite comme désordonnée en solution, il est donc possible que cet élément intervienne dans la stabilisation du polymère au niveau de la membrane.

8.3 Recrutement de CHMP2B par CHMP4B

La présence de CHMP4A et CHMP4B à la base des protrusions a été mise en évidence à partir d'expériences d'immunofluorescence. Par SPR, l'interaction mesurée entre CHMP4B et CHMP2B (de l'ordre du microMolaire) suggère que les deux protéines puissent former un **complexe transitoire** même en l'absence de membranes. Dans le contexte d'un phénomène de surexpression, la cotransfection de CHMP4B et CHMP2B inhibe en revanche la formation des protrusions. Cette donnée suggère donc fortement **une régulation directe de CHMP2B par CHMP4B**. Toujours dans un contexte de surexpression, il est possible ici que la formation de complexes aberrants CHMP4B-CHMP2B dans le cytosol perturbe le mécanisme à l'origine de la formation des tubes au niveau de la membrane plasmique.

Les résidus impliqués dans cette interaction n'ont en revanche pas pu être déterminés précisément, les deux mutants CHMP2B testés interagissant avec CHMP4B d'une façon identique à celle observée pour la forme sauvage. Bien qu'un mutant CHMP2A ne liant plus CHMP4B ait été caractérisé dans la littérature (Morita et al., 2011), il reste donc à identifier précisément les résidus impliqués dans cette nouvelle interaction ; on notera toutefois que CHMP2A n'est pas incorporé dans les protrusions induites par CHMP2B. Inversement, la surexpression de CHMP2A n'induit pas de protrusions similaires dans les cellules testées. Il est donc possible que les modes de polymérisation des deux protéines et/ou de recrutement diffèrent sensiblement entre les deux isoformes. Sur le plan biochimique, l'identification d'un mutant CHMP2B incapable de lier CHMP4B pourrait permettre de répondre à une partie de ces questions à l'avenir.

8.4 Ordre d'assemblage des ESCRTs

L'ordre d'assemblage d'ESCRT-III chez la levure (Babst et al., 2002) a été proposé comme suit : **Vps20 > Snf7 > Vps24 > Vps2**. Cette séquence a été déterminée **indirectement** à partir de tests de complémentation.

Or, si on considère la nomenclature chez les mammifères, on aboutit à la séquence correspondante : **CHMP6 > CHMP4 > CHMP3 > CHMP2**. Les expériences de Morita sur le bourgeonnement du HIV (Morita et al., 2011) ont cependant montré une interaction directe entre CHMP4 et CHMP2. Par ailleurs, CHMP3 semble jouer un rôle accessoire dans ce phénomène de bourgeonnement. Compte tenu du rôle également accessoire de CHMP6, il suit donc la séquence simplifiée **CHMP4 > CHMP2A**. Les données recueillies sur CHMP2B vont également dans ce sens, et posent clairement le problème de la **validité du premier modèle de Babst, par rapport aux observations de Morita ainsi que les nôtres** ; en l'état il

paraît donc crucial de redéfinir la carte d'interaction entre ces différentes composantes de façon plus directe, afin de lever ces ambiguïtés.

La nature physiologique des protrusions CHMP2B induites dans l'étude n'est pas établie avec certitude. La présence de protrusions spécifiquement à la membrane plasmique est atypique, en ce sens que cette membrane est distincte de la membrane des endosomes. Ce phénomène est donc également distinct de la maturation des corps multivésiculaires et pourrait s'apparenter plutôt au rôle général des protéines ESCRT dans l'étape d'abscission (Guizetti et al., 2011 ; Elia et al., 2011), ou à leur recrutement au point de bourgeonnement de certains virions (Martin-Serrano J, Neil SJ., 2011, Morita et al., 2011). Il pourrait encore être lié au rôle proposé de CHMP2B dans la formation des épines dendritiques (Belly et al., 2010).

Bien que la protéine CHMP2B ait été impliquée dans des pathologies de démences fronto-temporales (Skibinski et al., 2005 ; Filimonenko et al., 2007 ; Lee et al., 2007), le lien entre ces protrusions et la physiopathologie de la maladie est également incertaine. En l'état cette étude met donc en évidence des **propriétés physiques** particulières de la protéine CHMP2B, mais sa signification biologique (en particulier au niveau du système nerveux central) reste donc à déterminer.

Annexes

Revue : Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission

Suman Peel, Pauline Macheboeuf, Nicolas Martinelli and Winfried Weissenhorn.

Trends in Biochemical Sciences, 2010.

Contexte de l'étude:

ESCRT-III est impliqué dans des processus de remodelage membranaire au sein de plusieurs voies, en particulier le bourgeonnement du HIV, la division cellulaire et l'internalisation de récepteurs à la surface des endosomes. Cette revue récapitule ces différentes fonctions, ainsi que les modèles de scission membranaires qui ont été proposé à ce jour.

Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission

Suman Peel¹, Pauline Macheboeuf², Nicolas Martinelli² and Winfried Weissenhorn²

¹ Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, University Walk, University of Bristol, Bristol BS8 1TD, UK

² Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI) UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz 38042 Grenoble, France

Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) have been implicated in topologically similar but diverse cellular and pathological processes including multivesicular body (MVB) biogenesis, cytokinesis and enveloped virus budding. Although receptor sorting at the endosomal membrane producing MVBs employs the regulated assembly of ESCRT-0 followed by ESCRT-I, -II, -III and the vacuolar protein sorting (VPS)4 complex, other ESCRT-catalyzed processes require only a subset of complexes which commonly includes ESCRT-III and VPS4. Recent progress has shed light on the pathway of ESCRT assembly and highlights the separation of tasks of different ESCRT complexes and associated partners. The emerging picture suggests that among all ESCRT-catalyzed processes, divergent pathways lead to ESCRT-III assembly within the neck of a budding structure catalyzing membrane fission.

Receptor downregulation: the prime function of ESCRT
Removal of receptors from the plasma membrane and their delivery to lysosomes is an essential step in the regulation of cellular signaling processes. Great progress has been made in deciphering the molecular machinery that is at the base of receptor sorting at the endosomal membrane. Briefly, target receptors can be ubiquitinated and via endocytosis delivered to the membrane of the early endosome. Receptors, such as activated epidermal growth factor receptor (EGFR) are destined for degradation, whereas others cycle back to the plasma membrane or to the trans-Golgi network and biosynthetic pathway via recycling tubules [1]. Cargo marked for degradation is sorted into vesicles that bud into the lumen of endosomes, which progress into multivesicular bodies (MVBs) and then fuse with lysosomes (or the vacuole in yeast) for vesicle and cargo degradation [2,3]. Both sorting of receptors into vesicles and the biogenesis of the vesicles require endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT-0, -I, -II, -III) and the vacuolar protein sorting (VPS)4 complex [2,4,5]. Additional lipid-dependent pathways might contribute to intraluminal vesicle formation [6]. In addition to MVB biogenesis, all ESCRT are recruited during autophagy, although their role in the process is unclear, and part of the ESCRT machinery, including ESCRT-III and VPS4, catalyze topologically similar processes during cytokinesis and budding of some enveloped viruses (Box 1) [3,7]. Thus, ESCRT play an essential role in diverse fundamental

Glossary

ALIX (Alg2 interacting protein X): also known as AIP1. ALIX contains an N-terminal BRO domain linked to a middle V domain and an extensive C-terminal unstructured polyproline rich domain (PRD). The PRD interacts with several different ligands including CEP55 and TSG101, the V domain interacts with viral L domains and the BRO domain targets the C-terminal acidic region of CHMP4.

AMSH (associated molecule with the Src homology 3 domain of STAM): also known as STAMBP. A ubiquitin hydrolase specific for K63-linked chains.

CHMP (Charged Multivesicular Body Protein): represents a family of small helical proteins that contain an N-terminal basically charged region and a smaller C-terminal acidic region. Yeast expresses seven CHMP family members and mammalian cells express 12, including one or more isoforms of each yeast protein. Four members [Vps20 (CHMP6), Snf7 (CHMP4), Vps24 (CHMP3) and Vps2 (CHMP2)] assemble into a core ESCRT-III complex in yeast, whereas the others play regulatory roles in ESCRT-III and Vps4 assembly. CHMP proteins are highly conserved in all eukaryotes and a few members in *Crenarchaea* catalyze cell division.

DUIIM (double ubiquitin interacting motif): DUIIMs are present in several proteins involved in protein trafficking, which can bind two ubiquitin molecules simultaneously.

FTD (frontotemporal dementia): FTD is the second most common form of degenerative dementia after Alzheimer's disease. Approximately 40% of FTD cases are familial and FTD causing mutations are found in a variety of genes including *CHMP2B*.

GUV (giant unilamellar vesicle): GUVs are assembled *in vitro* with sizes varying from 5 to 200 μm . They are used as membrane model systems to study membrane deformation processes depending on certain lipid compositions and/or protein scaffolds by using fluorescence microscopy.

MIM (MIT domain interacting motif): MIMs are found in the C-terminal acidic regions of ESCRT-III proteins; several MIMs have been identified which either form short helices or extended conformations in complex with MIT.

MIT (microtubule interacting and trafficking domain): MIT domains are present in many trafficking proteins including the AAA+ ATPases Vps4 and spastin and the ubiquitin hydrolases AMSH and UBPY. MIT domains are targets for ESCRT-III interaction.

NEDD4 (Neuronal precursor development downregulated protein 4): NEDD4 belongs to a family of E3 ubiquitin ligases that employ HECT (homologous to E6AP carboxyl terminus) domains to catalyze the final transfer of ubiquitin to its target.

UEV: ubiquitin E2 variant domain present in the ESCRT-I protein TSG101. The domain is structurally related to E2 ubiquitin ligases but enzymatically inactive. The TSG101 UEV binds ubiquitin and the sequence motif PTAP that is present in hepatocyte growth factor or viral late domains.

VHS (domain present in Vps27, HRS and STAM): VHS domains are present in several proteins involved in protein trafficking. Both ESCRT-0 STAM and HRS contain VHS domains, which bind ubiquitin.

Vps (vacuolar protein sorting): proteins that function in the MVB pathway are referred to as class E Vps proteins. Deletion of each VPS gene leads to MVB sorting defects and the accumulation of aberrant membrane structures called 'class E compartment'. Proteins forming the ESCRT complexes and associated proteins including Vps4 are part of the class E Vps protein family. ESCRT were first identified in yeast and ESCRT-0 is composed of Vps27 and Hse1; ESCRT-I is composed of Vps23, Vps28, Vps37 and Mvb12; ESCRT-II is composed of Vps22, Vps25 and Vps36 and ESCRT-III comprises Vps2, Vps20, Vps24, Snf7 and ESCRT-III-like members are Did2, Vps60 and Ist1 (mammalian ESCRT-III homologs are listed in Table 1).

VPS4: VPS4 belongs to a family of AAA-type ATPases acting during diverse cellular processes. Each enzyme contains one or two AAA motifs including the Walker homology sequences of P-loop ATPases. Cytosolic catalytically inactive dimeric VPS4 assembles into active oligomers in the presence of ATP. VPS4 was reported to assemble either into two stacked hexameric-ring-like structures or into rings composed of seven protomers. It is required to disassemble ESCRT-III from membranes.

Corresponding author: Weissenhorn, W. (weissenhorn@embl.fr)

Box 1. ESCRT-catalyzed membrane deformation processes

ESCRT are recruited to form multivesicular bodies, to catalyze budding of some enveloped viruses, to catalyze late steps in cytokinesis and during autophagy [2,3,5,7]. These seemingly unrelated processes share a topologically similar budding event away from the cytosol that requires separation of two-membrane enveloped structures via a membrane fission step. ESCRT-III was identified as the minimal membrane fission machinery [76,78]; it most probably assembles within a membrane neck structure formed during budding of vesicles and some enveloped viruses as well as at the midbody of two dividing daughter cells. The higher order assembly of ESCRT-III is then thought to constrict the membrane neck leading to fission. The ESCRT requirement in autophagy is less clear [81], but might encompass the closure of the autophagosome. Membrane fission catalyzed by ESCRT-III is conceptually similar to membrane narrowing by dynamin, but with a crucial difference in membrane topology. Dynamin, which separates endocytotic vesicles from the plasma membrane, forms short helical assemblies on the outside of a membrane neck, which induces neck thinning and membrane fission [82]. By contrast, ESCRT-III probably assembles on the inside of a membrane neck and induces constriction leading to neck thinning that can drive membrane fission [58,65,76,78]. It remains unclear whether the energy required for fission comes from the formation of ESCRT-III polymers alone or from additional input by VPS4 ATP hydrolysis.

cellular processes and malfunctions due to genetic mutations in some ESCRT members lead to a variety of diseases including cancer and neurodegenerative disorders [3,8].

This review will focus on the recent progress that has been made in elucidating the complexity of ESCRT function in diverse cellular and pathological processes and will discuss the potential structural principles that could form the basis of ESCRT-driven membrane remodeling processes including bud formation and membrane constriction leading to membrane fission.

ESCRT complex assembly at the endosomal membrane

The ESCRT machinery consists of five complexes, ESCRT-0, -I, -II, -III and VPS4, regulated by associated partners which are recruited in a sequential manner to the endosomal membrane [2,4,5]. The endosomal membrane is enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) and the linkage of MVB sorting and phosphatidylinositol signaling is underlined by the essential role of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) Vps34, for MVB sorting [9]. Consequently, ESCRT-0 binds PI3P via the hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (HRS) FYVE domain [10] and ESCRT-II via the GLUE domain of Vps23 [11]. Much progress has been made in assembling structural models of ESCRT-0 [12], ESCRT-I [13], ESCRT-II [14] and VPS4 [15,16] based on crystal structures of subcomplexes and individual domains as well as electron microscopy imaging (EM) (Figure 1a–c). Although different low resolution models of ESCRT-III subcomplexes exist, the structure of the core ESCRT-III complex [17] remains elusive.

Despite the available structural information, it remains unclear how ESCRT assemble on membranes and sort receptors into specific membrane patches that are remodeled to become vesicles. Although ESCRT-0 might concentrate ubiquitylated cargo via its ubiquitin interacting motif (UIM) and VHS (domain present in Vps27, HRS and STAM) ubiquitin binding domain [18], it is not known how sorting into vesicles or recycling is decided and how this is

coupled to deubiquitylation, coordinated by ubiquitin hydrolases Doa4 or the mammalian isoforms AMSH (associated molecule with the Src homology 3 domain of STAM) and the Ub-specific protease Y (UBPY) acting at early and late stages of the ESCRT pathway [19].

ESCRT and virus budding

Enveloped viruses recruit some of the ESCRT machinery by employing structural proteins, such as HIV-1 Gag, which contain short sequence motifs termed late domains (L domains). Different L domains recruit the tumor suppressor gene 101 (TSG101; L domain, PTAP), the ESCRT-associated ALG-2 (apoptosis-linked gene 2)-interacting protein X [ALIX; L domain, LYPX(n)L] (see Glossary) or members of the HECT (homologous to E6AP carboxyl terminus) family of E3 ligases including neuronal precursor development downregulated protein 4 (NEDD4; L domain, PPXY) [7,20–22]. Some viruses employ more than one L domain to access the ESCRT machinery [7]. HIV-1 recruits both TSG101 and ALIX; whereas the ESCRT-I member TSG101 is more important than ALIX for HIV-1 budding [23], mutations in the HIV-1 Gag TSG101-specific L domain (PTAP) are compensated by ALIX overexpression [23]. The HIV-1 requirement for ESCRT-I can be further bypassed by the ubiquitin ligase NEDD4-2 [24,25] and the equine infectious anemia virus (EIAV) requirement for ALIX can be overcome by fusing the C-terminal domain of VPS28 to EIAV Gag lacking the cognate L domain [26]. Thus, mutations within one L domain can be compensated by overexpression of other L domain ligands. However, their exact contribution beyond providing access to ESCRT-III and a functional VPS4 complex remains unclear. Although little is known about the dynamics of ESCRT-III assembly at budding sites, ESCRT might function during early steps of HIV-1 budding; indeed, it has been suggested that their role is not restricted to membrane fission [27].

Although enveloped viruses are excellent model systems to study ESCRT function, budding of some enveloped viruses including influenza and respiratory syncytia virus does not depend on VPS4 [28,29]. How do these ESCRT-independent enveloped viruses catalyze membrane fission? One possibility is that viral structural proteins can provide the ESCRT-III function by forming similar polymers. Alternatively, viral proteins might modulate or generate lipid microdomains, which can induce spontaneous fission or recruit yet unknown cellular machines that can catalyze topologically similar budding processes [28].

ESCRT and cell division

ESCRT-I protein TSG101 and ALIX are recruited to the midbody during cytokinesis [30,31] by direct interactions with the phosphoprotein CEP55 [32], which is an essential factor for membrane fission [33]. Moreover, dominant negative constructs and siRNA depletion studies showed that all human ESCRT-III proteins and VPS4 (Table 1) are important for the completion of cytokinesis [30,31,34–37], a process which has been linked to PI3P signaling [38].

Surprisingly, VPS4 is also found at spindle poles during mitosis prior to midbody localization. Depletion of individual ESCRT-III and VPS4 proteins changes centrosome and

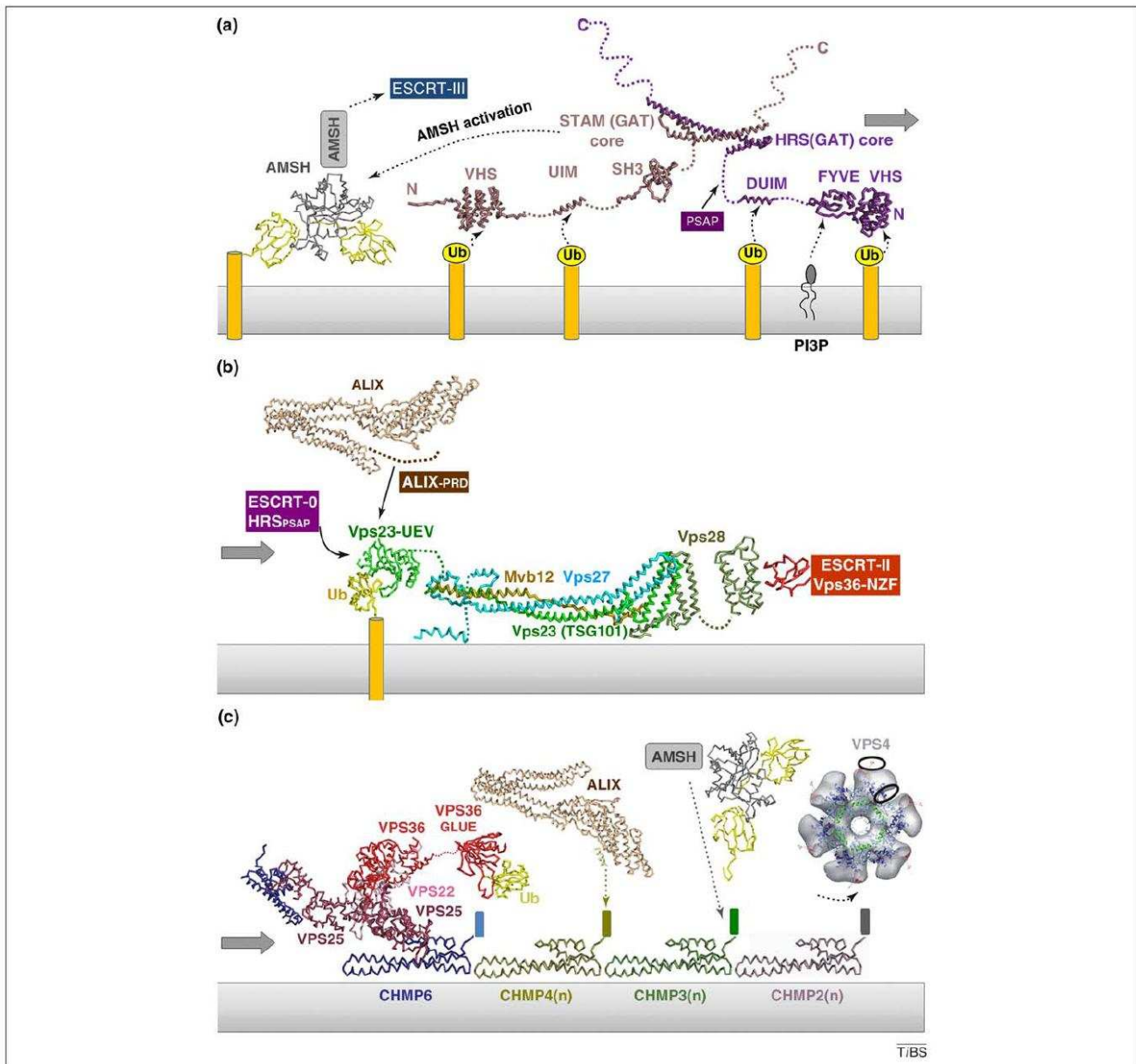


Figure 1. Hybrid structural models of ESCRT complexes. The models were assembled from crystallographic structures of core complexes and individual domains derived from homologous yeast or human proteins. The flexible connection of domains is indicated by dashed lines and their orientations are arbitrary. (a) The ESCRT-0 complex. The core of ESCRT-0 STAM (yeast Hse1) and HRS (yeast Vps27) form two domain-swapped GAT domains [12] with extended C-terminal regions of unknown structure. Preceding the GAT domains, both HRS and STAM contain ubiquitin binding VHS domains [18]. In HRS, this is followed by a PI3P-specific FYVE domain, a double ubiquitin interacting domain (DUIM), a presumably unstructured region containing the PSAP motif responsible for the ESCRT-I-TSG101 interaction connecting to the GAT domain. In STAM, the VHS domain is linked to UIM and SH3 domains. Thus, multiple ubiquitin recognition sites increase the avidity for K63-linked polyubiquitin chains potentially attached to cargo [18]. Notably, the STAM SH3 domain interacts with and activates the ubiquitin hydrolase AMSH (the N-terminal domain is indicated as a gray box and the structure of the C-terminal domain is shown in complex with diubiquitin) specific for K63 linked ubiquitin [19,83], thereby placing ubiquitin turnover at an early stage of the pathway. (b) The ESCRT-I complex. ESCRT-0 uses a PSAP motif to interact with TSG101 (Vps23), which is part of the elongated ~27 nm long heterotetrameric ESCRT-I complex [Vps23 (TSG101); Vps28; Vps37 and Mvb12] [13]. The N-terminal ubiquitin E2 variant (UEV) domain of TSG101 binds to ESCRT-0 (HRS, PSAP), ALIX (PTAP and/or PSYP), present in the proline rich domain, PRD), ubiquitin and viral L domains and is flexibly linked to the stalk region. Notably, Vps37 contains an N-terminal helix ($\alpha 0$) that enhances the membrane interaction of ESCRT-I. In humans, MVB12 exists as two and VPS37 as three different isoforms leading to the formation of distinct ESCRT-I complexes with yet unknown functions. In yeast, the C-terminal domain of Vps28 recruits ESCRT-II via an interaction with the N-terminal Np14 zinc-finger (NZF) domain present in the Vps36-Glue domain of ESCRT-II [84]. (c) The ESCRT-II complex triggers ESCRT-III assembly. ESCRT-II is composed of VPS22, VPS36 and two copies of VPS25 that adopt a Y-shaped structure [4,5]. ESCRT-II is targeted to the endosomal membrane by lipid-binding activities of the VPS36 GLUE domain and the first helix of VPS22 ($\alpha 0$) [14]. The VPS36 GLUE domain also binds ubiquitin and yeast Vps36 has two additional NZE zinc-finger domains inserted [4]. VPS25 interacts with an N-terminal helical segment of CHMP6 (Vps20) [77], which triggers the assembly of the ESCRT-III complex in yeast [60]. Vps20 nucleates the assembly of an unknown number (n) of Snf7 (CHMP4) molecules which might be followed by a 1:1 stoichiometry of Vps2 (CHMP2) and Vps24 (CHMP3). In mammalian cells, the C-terminal regions of CHMP4 and CHMP3 recruit ALIX (via its BRO1 domain) and the deubiquitylating hydrolase AMSH (via its N-terminal domain), respectively [83]. All CHMP molecules contain MIMs within their C-terminal regions (indicated by solid-colored rectangles) that are targeted by the VPS4 MIT domain. VPS4 is modeled as a hexameric ring-structure based on EM single particle analysis; the EM model of VPS4 is reproduced with permission from [16]). Note that this does not represent the VPS4 complex active in cells. ESCRT-II binds two Vps20 (CHMP6) molecules and both might trigger Snf7 polymer assembly [60], a process which might require a curved membrane for assembly initiation.

Table 1. ESCRT-III proteins, their interaction partners and their proposed biological roles

Complex	Mammalian homolog	Yeast homolog	Cellular binding partners ^a	Proposed biological role	Refs (interactions)
ESCRT-III	CHMP6	Vps20	CHMP4/Snf7 ^b , VPS25/Vps25, VPS28/Vps2, VPS4/Vps4	MVB formation	[74,88,89] [26,60]
	CHMP4A	Vps32 (Snf7)	CHMP6, Vps20, ALIX, Bro1, BROX ^c , VPS4, Vps4, CHMP4A, Snf7, Rim20 ^d , Rim13	MVB formation, cytokinesis	[88,90–92] [55,89,90,93,94]
	CHMP4B	Vps32 (Snf7)	CHMP6/Vps20, ALIX, Bro1, BROX, Rim20, Rim13, HD-PTP ^e , VPS4, CHMP4B, Snf7, CHMP7, TTC19 ^f , CALPAIN7	MVB formation, autophagy, viral budding, cytokinesis, multipolar spindle, nuclear morphology	[38,50,88–90, 92–96]
	CHMP4C	Vps32 (Snf7)	CHMP6, Vps20, ALIX, Bro1, BROX, VPS4, Vps4, UBPY, Rim20, Rim13	MVB formation, cytokinesis, multipolar spindle, nuclear morphology	[88,90] [89, 92–94,97]
	CHMP3	Vps24	AMSH, Vps24, CHMP2A, Vps2, Did2 ^g , Vta1 ^h , 4 VPS, Rim13	MVB formation, viral budding, cytokinesis	[51,54,58,64, 73,89,98,99]
	CHMP2A	Vps2	AMSH, MITD1 ⁱ , VPS4, CHMP2A, Vps2, CHMP3, Vps24, VTA1, γ 2-Adaptin	MVB formation, viral budding, cytokinesis, monopolar spindle	[36,51,54,58,100]
	CHMP2B	Vps2	VPS4	MVB formation, autophagy, cytokinesis, multipolar spindle, nuclear morphology, neurodegeneration	[72]
ESCRT-III like	CHMP1A	Vps46 (Did2)	MITD1, UBPY, AMSH, IST1 ^j , VPS4, Vps4, Vta1	MVB formation, viral budding, cytokinesis, multipolar spindle, nuclear morphology	[51,69,72, 97,98] [36,101]
	CHMP1B	Vps46 (Did2)	MITD1, UBPY, AMSH, IST1, VPS4A, Vps4, VTA1, Vta1, SPASTIN, CALPAIN7, PalBH	MVB formation, viral budding, cytokinesis, nuclear morphology	[36,54,57,75, 96–98,102]
	CHMP5	Vps60 (Mos10)	VTA1, Vta1	Viral budding, cytokinesis, monopolar spindle	[103]
	IST1	Ist1	VPS4, Vps4, CHMP1, Did2, MITD1, SPASTIN SPG4 ^k , SPARTIN SPG20 ^l , VTA1, Vta1, AMSH, UBPY, Ist1	MVB formation, cytokinesis	[36,37,57,104]
	CHMP7	–	CHMP4B, UBPY	MVB formation, nuclear morphology	[95,97]
VPS4 complex	VPS4A,B (SKD1)	Vps4	CHMP1, Vps46, CHMP2, Vps2, CHMP3, Vps24, CHMP4, Snf7, CHMP6, Vps20, IST1, Ist1, VPS4, Vps4, VTA1, Vta1, RND2 ^m	MVB formation, viral budding, cytokinesis, multipolar spindle, nuclear morphology	[45,69,73, 101,105,106]
	VTA1 (LIP5, DRG-1)	Vta1	CHMP1B, Did2, CHMP2A, CHMP3, CHMP5, Vps60, VPS4, Vps4, IST1, Ist1, AQP2 ⁿ , VTA1, Vta1, EGFR ^o	MVB formation, viral budding	[45,101,103, 106–108]

^aThe list of interaction partners is based on interactions confirmed by structural studies or pull-downs. Further potential ESCRT interactions for the yeast system can be found at <http://www.yeastgenome.org>.

^bSucrose Non-Fermenting 7.

^cBro1-domain containing protein X.

^dRab3-Interacting Molecule.

^eHis domain phosphotyrosine phosphatase.

^ftetraTriCopeptide repeat domain 19.

^gDOA4-Independent degradation protein 2.

^hVps20-associated 1.

ⁱMIT domain-containing protein 1.

^jIncreased sodium tolerance 1.

^kSpastic paraplegia 4.

^lSpastic paraplegia 20.

^mRho-related GTP-binding protein RhoN precursor (Rho family GTPase 2).

ⁿAquaporin 2.

^oEpidermal growth factor receptor.

spindle pole numbers, which produces multipolar spindles (most ESCRT-III/VPS4 proteins) or monopolar spindles [charged multivesicular body protein (CHMP) 2A or CHMP5] associated with defects in chromosome segregation and nuclear morphology [35]. These observations are consistent with the presence of CHMP3 and CHMP4 at kinetochores [39] and the role of the CHMP4B interacting

protein CC2D1A in centrosome duplication [40]. Recent research on Archaea demonstrated that Crenarchaeota, one of the five archaeal phyla, employ ESCRT-III and Vps4-like proteins in cell division [41,42]. In light of this evolutionary relationship between Archaea and Eukaryota, however, why does yeast not seem to employ ESCRT-III for binary cell division?

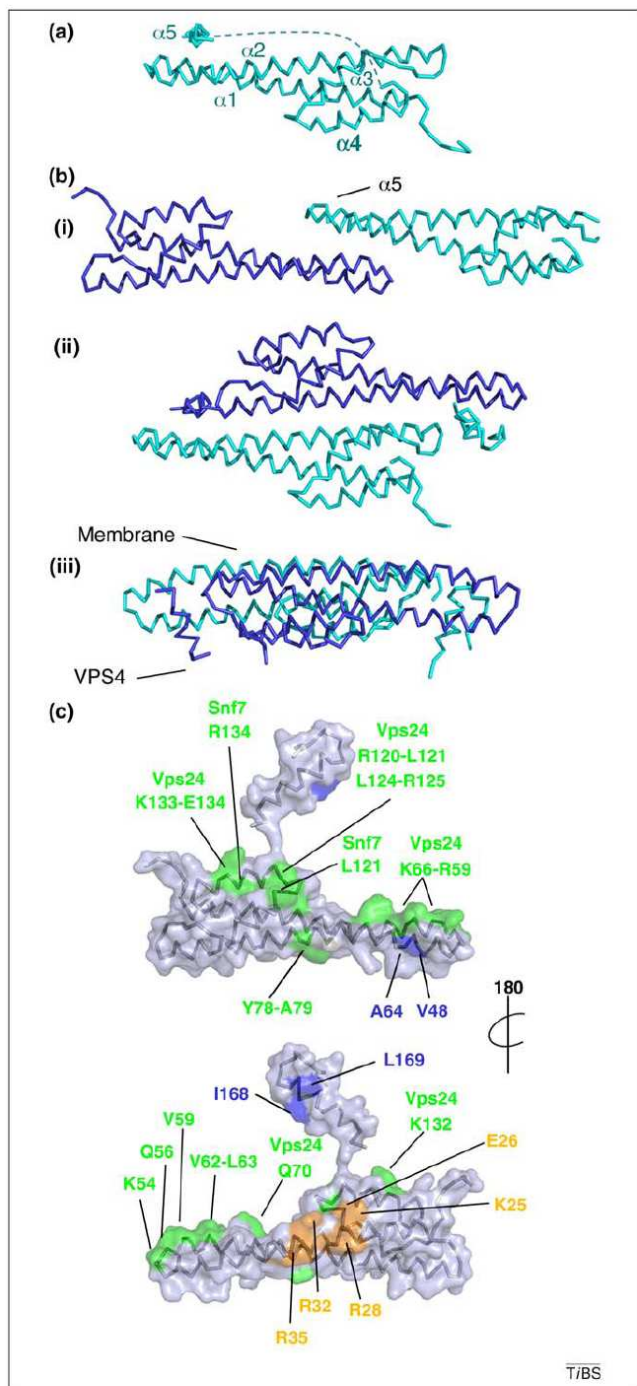


Figure 2. Structural properties of ESCRT-III. ESCRT-III proteins consist of a major N-terminal 7 nm long helical domain (α 1–4) and a shorter C-terminal region (including α 5) that harbors ligand binding motifs (VPS4 MIT, ALIX, AMSH). They shuttle between an autoinhibited cytosolic state and an activated membrane-bound polymeric state. Activation entails dissociation of the C-terminal region from the core, which in turn permits interaction with VPS4 for polymer disassembly and recycling. (a) The crystal structure of CHMP3 (shown here) and the structure of the ESCRT-III member IST1 reveal that the C-terminal region including α 5 binds to the tip of the helical hairpin (α 1 and α 2) [54], perhaps rendering ESCRT-III proteins inactive. Activation involves the displacement of the C-terminal region (including α 5) from the N-terminal core, which leads to polymerization and membrane targeting. However, this structural model does not fully explain how autoinhibition prevents polymerization, because most helical hairpin residues implicated in dimerization, as indicated in (b), are located on the opposite side of the α 5 binding site. (b) The crystal structure of CHMP3 indicates two antiparallel dimerization modes, which might be involved in ESCRT-III polymerization: (i) first, via the tip of the helical hairpin, and second (ii) via interaction along the helical hairpin. Note that the latter arrangement, rotated by

Differential employment of ESCRT

Comparative studies on ESCRT function during MVB biogenesis, enveloped virus budding and cytokinesis have begun to elucidate the complexity of ESCRT. Notably, although ESCRT-0 and -II are essential for MVB sorting, they are not required for enveloped virus budding or cytokinesis [7]. Differences in requirements for ESCRT-III are also evident. First, Vps20 is essential for MVB sorting in yeast [43], whereas CHMP6 is dispensable for enveloped virus budding and cytokinesis [7]. In addition, CHMP4B is more important for HIV-1 budding, whereas CHMP4C is recruited during cytokinesis [44]. Similarly, increased sodium tolerance-1 (IST1) is required for cytokinesis, but not for HIV-1 budding [36,37], and deletion of *IST1* in yeast does not induce cargo sorting defects at the endosome [45,46]. Finally, CHMP2B functions during cytokinesis [35] and *CHMP2B* mutations lead to late onset frontotemporal dementia (FTD), which might be due to receptor missorting [8], defects in autophagic clearance [47] or defects in the maturation of dendritic spines [48]. The next layer of complexity is at the level of associated molecules such as ALIX. In addition to its multiple cellular functions [49], ALIX is important for budding of some enveloped viruses and is essential for cytokinesis [44], but dispensable for EGFR sorting [50]. Thus, more functional studies are required to elucidate the exact role of different ESCRT and their selective recruitment to specific biological processes.

ESCRT-III composition and regulation

Yeast express seven and mammalian cells 12 ESCRT-III-like proteins comprising single or multiple homologs of each yeast protein (Table 1). Their function is universal to all ESCRT-catalyzed processes [2,3,5]. ESCRT-III proteins are autoinhibited in the cytosol by virtue of an interaction between the C-terminal region and the N-terminal core [51–54]. ESCRT-III protein activation leads to the displacement of the C-terminus and induces membrane targeting and polymerization *in vivo* [52,55,56]. The structure of C-terminally truncated CHMP3 (residues 9–183) comprises a long helical hairpin that together with two short helices form a four helical bundle. The fifth helix might be involved in heteropolymer formation or interact with the tip of the helical hairpin constituting the autoinhibitory cytosolic CHMP3 conformation (Figure 2a) [54,56]. However, the remaining C-terminus might also contribute to autoinhibition. Indeed, mutants that interfere with the helix 5–hairpin interaction exert only a mild dominant negative effect on HIV-1 budding [54]. Moreover, in the absence of such autoinhibition, the C-terminus would be available for ligand interaction in an unregulated way. ESCRT-III proteins form polymers on membranes [43], which for CHMP3 [56] and probably also IST1 [54,57] requires a basic interaction surface. This finding is consis-

90° (iii), produces a slightly curved membrane interaction surface, whereas the C-terminus points into the opposite direction [56] facilitating interaction with the VPS4 MIT domain [42,72–75]. (c) Amino acid substitutions tested for activation and polymerization of CHMP proteins; green, amino acid substitutions affecting polymerization; blue, amino acid substitutions affecting activation; and orange, amino acid substitutions affecting membrane targeting and polymerization; highlighted residues are based on Vps24 [64] and Snf7 sequences (as indicated) [59] or on CHMP3 [54,56].

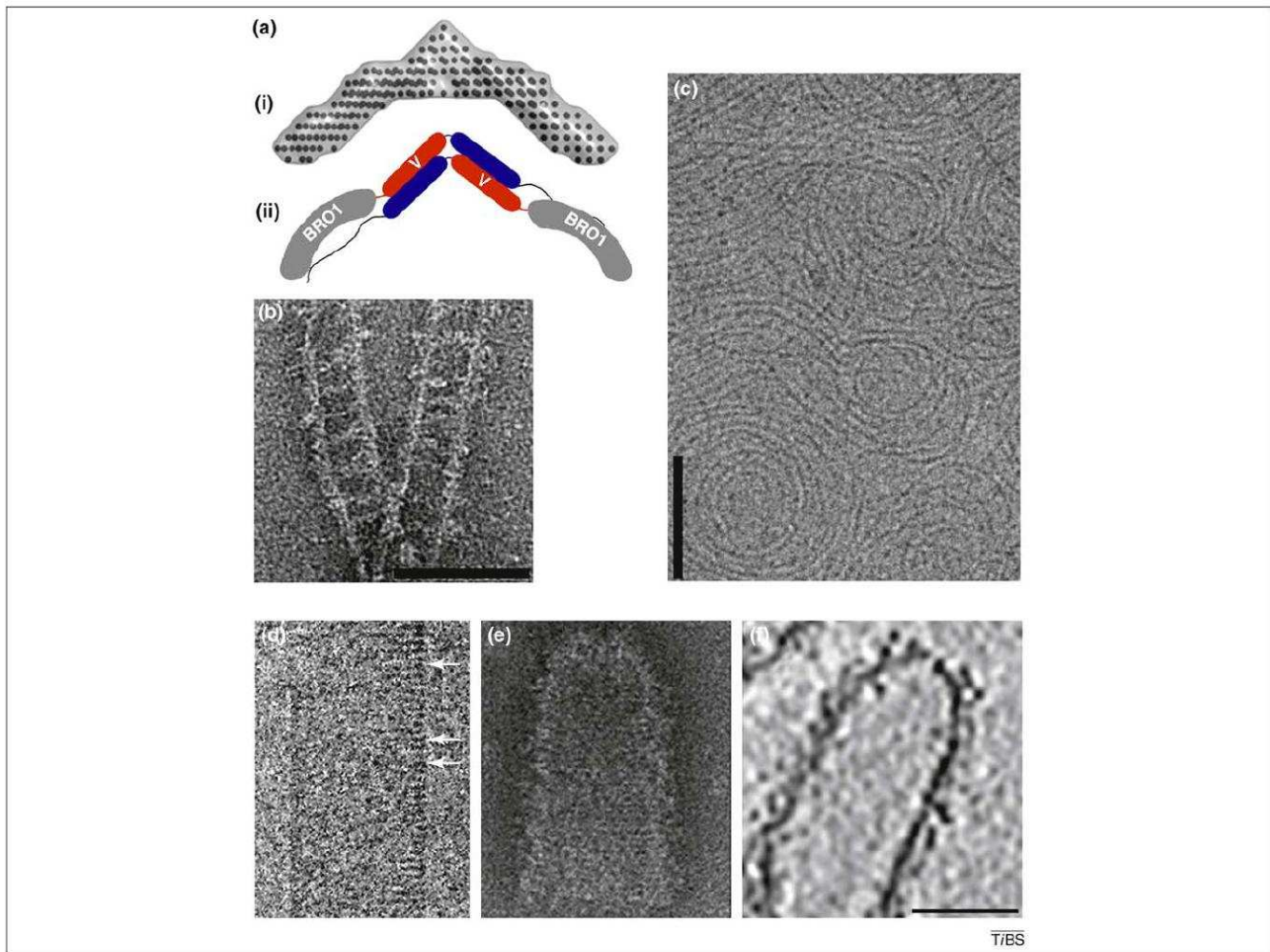


Figure 3. Polymerization of ESCRT-III *in vitro*. ESCRT-III CHMP4B and CHMP2A together with CHMP3 form two distinct polymers *in vitro* in the absence of membrane interaction. Both types of polymers might play roles in membrane remodeling processes leading to vesicle formation and membrane fission as outlined in the models shown in Figure 4. In addition, CHMP4B filaments can be targeted by an activated dimeric form of ALIX, which might help to coordinate CHMP4 polymer assembly or its position on membranes *in vivo*. (a) Monomeric ALIX (shown in Figure 1b and c) can switch to a dimeric state, which involves domain exchange within the middle V domain. (i) Dimeric ALIX was modeled based on SAXS analysis and mutagenesis studies [61]. (ii) A sketch model of the dimer; the BRO1 domain (gray) is linked to the middle domain. In the monomer structure the middle domain is V-shaped and composed of two 3-helical bundles (indicated in red and blue) [85,86], which open up to mediate antiparallel dimerization [61]. The PRD domain is not shown in the SAXS model. (b) Dimeric ALIX specifically crosslinks two CHMP4 filaments *in vitro* producing ladder-like structures as evidenced by negative staining EM. (c) CHMP4B forms arrays of loose circular 30 Å thick filaments *in vitro* as visualized by cryo-EM. No lateral interactions between filaments are observed. Scale bars are 100 nm (panels a, b and c are reproduced with permission from [61]). (d) Cryo-electron micrograph of a CHMP2A-CHMP3 helical tubular structure; the striation (indicated by arrows) might indicate the repeating helical turns. The diameter can vary, but is ~50 nm in most cases. The tube exposes the membrane targeting surface on the outside and the VPS4 binding site on the inside facilitating tube disassembly *in vitro*. Short tubular structures with (n) helical turns could thus assemble on the inside of a budding neck. The tubular structures can be closed at one end as evidenced from a negative stained image (e) and from the cross-section of an EM of a CHMP2A-CHMP3 tube (f). The dome-like structures of the closed tubes might attract and bend membranes within the neck of the bud and thus contribute to thinning of the membrane neck and membrane fission (see Figure 4d). Scale bar is 40 nm (portions of panels d, e and f are reproduced with permission from [58,65]).

tent with the requirement of negatively charged phospholipids for CHMP2A- and CHMP3-membrane interaction *in vitro* [58].

ESCRT-III polymerization

Yeast ESCRT-III assembly [43] follows the sequential recruitment of Vps20, Snf7, Vps24 and Vps2 into a 450-kDa large complex that can deform membranes *in vitro* [59]. Snf7, which is implicated in cargo sequestering, is the most abundant factor in the complex, whereas Vps24 and Vps2 are present in a 1:1 stoichiometry [17]. Snf7 polymerization is triggered by interactions with ESCRT-III component Vps20, which contacts both Vps25 arms present in ESCRT-II (Figure 1c) to nucleate the formation of two Snf7

filaments [60]. This function might be provided by ALIX in mammalian ESCRT-II-independent processes given that dimeric ALIX specifically crosslinks two CHMP4B filaments *in vitro* (Figure 3a and b) [61]. The regulated assembly of Snf7 polymers might act as a molecular ruler, whereas the polymer length could determine the final diameter of MVB vesicles and thus involve ESCRT-III at early steps of the budding process [60].

Although the composition and stoichiometry of the mammalian ESCRT-III complex has not yet been defined, low resolution structural information is available for sub-complexes and polymers. CHMP4A and CHMP4B form curved filaments positioned underneath the plasma membrane upon overexpression in COS cells, which theoretic-

cally suffices to induce tube formation by membrane buckling [62]. When coexpressed with catalytically inactive VPS4, the CHMP4 filaments induce the formation of membrane tubules with diameters of 100–120 nm emanating from the plasma membrane; smaller buds are formed by expression of a truncated CHMP4B(1–116) [63]. *In vitro* CHMP4B assembles into thin ~3 nm thick circular filaments (Figure 3c) and ring-like structures [61,64]. The CHMP4B filament diameter (~3 nm) suggests that the polymer is assembled by head-to-tail interactions of CHMP4 monomers. Although mutagenesis studies suggested a number of contact surfaces important for polymerization including the tip of the helical hairpin (Figure 2b and c) [54,56], the precise structural principle of CHMP polymer assembly is unresolved.

Yeast Vps24 assembles into three-stranded helical filaments *in vitro* as determined by EM [64]. Given that the molecular packing of Vps24 monomers in the polymer sequesters the proposed membrane targeting surface [56], it remains unclear whether these filaments could assemble on membranes. Although the Vps24 and CHMP3 sequences are conserved, CHMP3 does not form homopolymers on its own but instead assembles with CHMP2A into ~50 nm large helical tubular structures *in vitro* (Figure 3d) [58] which rely on helical hairpin residues for polymerization (Figure 2b and c) [54,58]. Molecular modeling indicated that CHMP2A–CHMP3 heterodimers unilaterally expose the membrane-targeting surface on the outside and project the VPS4 interaction site on the inside of the tubes. Confirmation of this modeling came from experiments in which large unilamellar vesicles bound the CHMP2A–CHMP3 helical structure via its outer surface, whereas VPS4 was recruited in the lumen and disassembled the polymer [58]. The helical CHMP2A–CHMP3 tubes can be closed at one end, thereby presenting a curved membrane-binding surface, which might be important for membrane fission (Figure 3e and f) [65]. The general proposal is that any CHMP polymer should assemble only at or on the inside of the neck of a bud, consistent with its exclusion from released vesicles or viruses.

Polymerization seems to be a universal feature of ESCRT-III members. IST1 assembles into large, potentially tubular, polymers with a diameter of ~700 nm which rely on IST1 tip-to-tip interaction surfaces. By contrast, CHMP1A polymerizes into tubes with smaller diameters of ~230 nm [54]. The function of such structures remains unclear and it should be noted that only CHMP4 filaments have been observed to deform membranes *in vivo* [63]; this, however, might depend on additional cellular factors. It thus remains a major challenge to determine the nature of transient ESCRT-III polymers *in vivo*. Nevertheless, the structural models are useful to formulate testable membrane fission models.

VPS4 targets ESCRT-III

In the absence of VPS4 activity, ESCRT-III polymers concentrate on endosomal membranes and inhibit receptor sorting [2]. Consequently, VPS4 is essential for all ESCRT-catalyzed processes; indeed, dominant negative VPS4 expression is used as a marker to detect ESCRT-dependence of biological processes. VPS4 shuttles between a catalyti-

cally inactive dimeric state and a catalytically active state [66], which is most likely a dodecamer, composed of two stacked hexameric rings (Figure 1c) [16].

A complex network of interactions with Vta1, Did2, Ist1 and ESCRT-III controls Vps4 recruitment and assembly in yeast [67,68]. Vta1 dimers regulate ATP-dependent Vps4 ring assembly by forming a 2:1 complex, exposing 18 microtubule interacting and trafficking (MIT) domains for interaction with effectors [69,70], whereas Did2 recruits Ist1 to endosomes and coordinates dissociation of ESCRT-III from membranes [45,46]. The Vps4 complex assembly model proposes the formation of a cytosolic Did2–Ist1–Vps4 recruitment complex that interacts first with ESCRT-III (Vps2 and Snf7) and subsequently with Vta1, which stimulates the assembly of the Vps4 oligomer active in ESCRT-III disassembly [68]. Because Did2 was proposed to play a role in the regulation of MVB luminal vesicle size [71], Vps4 complex assembly might be linked to vesicle formation.

ESCRT-III proteins recruit VPS4 via two C-terminal MIT domain interacting motifs (MIMs), which either form short helices or extended conformations in complex with MIT domains [42,72–75]. All human ESCRT-III members interact with similar affinities with the VPS4 MIT domain either via their MIM1 (CHMP1A and B, CHMP2A and B and CHMP3) or their MIM2 (CHMP4 and CHMP6) domains [72,74]. By contrast, yeast ESCRT-III proteins, with the exception of Vps2 and Did2, interact weakly with Vps4 MIT domains [59,73]. Thus, ESCRT-III VPS4 regulation might be more complex in mammals than in yeast; it will be of interest to determine the function of the 18 MIM binding sites present in the assembled VPS4–VTA1 oligomer.

The VPS4 complex disassembles ESCRT-III polymers from membranes and thus recycles ESCRT-III proteins. How this is achieved is currently not known, but could involve partial denaturation of substrate, which might pass through the central pore of VPS4 dodecamers directed by the VPS4 MIT domains and VTA1 [15,70]. ESCRT-0, -I and -II, however, are not removed from membranes in a Vps4-dependent manner [71].

ESCRT-catalyzed budding *in vitro*

Assays employing giant unilamellar vesicles (GUVs) revealed important direct insights into ESCRT-catalyzed budding *in vitro*. ESCRT-0 concentrates ubiquitylated cargo on the GUV membrane, ESCRT-I and -II form the vesicle and ESCRT-III catalyzes release [76]. Both ESCRT-I and -II have small membrane binding domains (Figure 1b and c) [5], which on their own probably do not deform membranes into vesicles. Thus, ESCRT-I and -II must form oligomers that can induce curvature; however, such structures have not been observed. Previous studies indicated that vesicles are also formed by a combination of ESCRT-II and ESCRT-III [77] or by ESCRT-III alone [78]; this process might be concentration-dependent [76]. Because the vesicles formed by either ESCRT-I and -II or ESCRT-III are large (~2 μm) [76–78], the manner in which MVB-specific vesicle sizes are achieved remains an open question. Although the GUV studies are insightful and support a role for ESCRT-III as the membrane scission

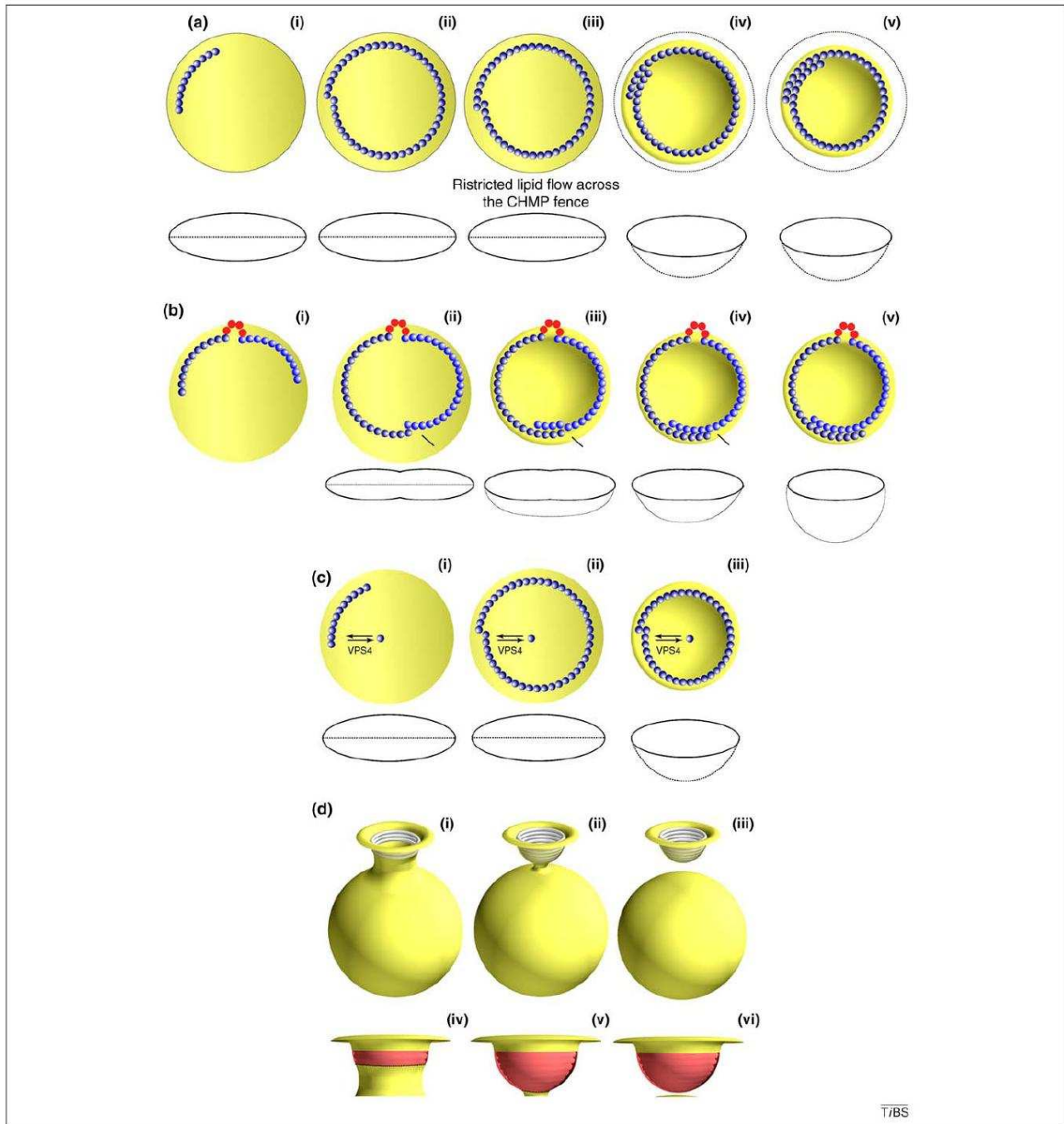


Figure 4. Models of ESCRT-III driven membrane deformation. Several models for membrane remodeling and scission have been proposed based on the polymeric ESCRT-III structures observed *in vitro* and *in vivo*. (a) Membrane buckling by one CHMP4 circular polymer. (i) Upon nucleation by the ESCRT-II proteins Vps25 and CHMP6 (not shown), the CHMP4 polymer (blue) grows into a near circular filament on the membrane by growing either in one or both directions to form an intrafilament contact (ii) leading to restriction of lipid flow across the CHMP4 fence (iii). The length of the filament determines the area of the membrane patch (yellow) and the size of the resulting vesicles. Upon sliding, the energy provided by the newly formed CHMP4-CHMP4 interaction interfaces might be responsible for the increasing strain on the filament and concomitant membrane buckling (iv, v). Membrane buckling leads to vesicle formation, indicated by a reduction of the CHMP4 encircled membrane line. (b) Membrane buckling by two CHMP4 polymers coordinated by two Vps25 molecules present in ESCRT-II (i). Nucleated by Y-shaped ESCRT-II and CHMP6 (together shown as red circles), two CHMP4 filaments (blue and light blue) grow on the membrane. (ii) The geometry of the ESCRT-II complex positions the two filaments such that a suboptimal interfilament CHMP4-CHMP4 contact is formed as the two filaments reach a specific length. This defect in CHMP4 packing could initiate rearrangement within the polymer (iii) which would appear as polymer sliding (iv) leading to membrane buckling (iii, iv, v). Lines indicate the position of the filament with suboptimal radius of curvature. (c) Membrane buckling by polymer shrinking. (i) The CHMP4 polymer assembles under the regulation of VPS4. Upon closing of the CHMP fence (ii), removal of CHMP subunits results in shrinking the polymer diameter thereby resulting in membrane buckling (iii). (d) Membrane constriction by the ESCRT-III CHMP2A-CHMP3 polymer scaffold. (i) Polymerization of a CHMP2A-CHMP3 copolymer (white) initiates within a preformed membrane neck. (ii) As the polymer grows into a dome shape, the membrane follows its shape owing to high affinity CHMP-membrane interactions leading to neck thinning and spontaneous membrane fission at a neck radius of ~3 nm (iii). The outer surface of the CHMP2A-CHMP3 dome is highly basic and might help to phase segregate negatively charged lipids (red) leading to formation of phase boundaries (iv). For reducing the length of the domain interface, and hence the interfacial energy, membranes are known to bud out and eventually cleave off spontaneously [87]. Thus, the same line tension effect might further facilitate membrane narrowing by the ESCRT-III induced membrane necks leading to membrane fission (v, vi).

machinery [76–78], several questions remain to be answered. First, is CHMP4 the minimal fission machinery [76]? Second, if so, what is the contribution of the other ESCRT-III core members (CHMP2 and 3) that are essential for MVB sorting, virus budding and cytokinesis [7,17,35,59]? Third, how do ESCRT-III polymers catalyze the fission reaction? For now, only the structures of ESCRT-III polymers observed *in vitro* can provide clues for answering these questions.

Models of ESCRT-III driven membrane deformation

Although the structural and biophysical information obtained so far is limited for accurately describing different molecular stages of ESCRT-III polymer growth and concomitant membrane transformations, several models for ESCRT-III-mediated membrane scission have been proposed [58,59,65,74,78,79]. Overall, there is a common theme of ESCRT-III polymer-induced membrane constriction on the inside of the neck of a bud leading to membrane fission. The proposed mechanisms can be broadly separated in three categories where the energy for membrane buckling is either provided by CHMP–CHMP interactions, by ATP or by CHMP–membrane interactions. The roles of lipids, which probably are important, have so far been largely neglected in these models.

Membrane constriction by polymer coiling

Given that CHMP4 can form polymeric filaments which extrude plasma membrane [63], it was proposed that structural rearrangements within the filaments could lead to membrane constriction and eventually membrane fission [79]. By using a given interaction interface, CHMP4 protomers might grow into a nearly circular filament on the membrane (Figure 4a). The packing geometry of the protomers might result in a suboptimal contact between one pair of adjacent CHMP4 protomers thereby leaving a “defect” in an otherwise perfectly packed filament. An additional but relatively “weak” CHMP4–CHMP4 interaction interface might allow one edge of the polymer to slip over the other edge. Furthermore, for sliding to occur, the kinetic barrier for breaking and remaking the next CHMP4–CHMP4 contact must be small. The energy gained from formation of a new CHMP4–CHMP4 interaction interface might pay for the increasing strain on the circular filament as its radius of curvature changes. If the CHMP4 filament could restrict the lipid flow by acting like a “fence”, and if the newly formed CHMP4–CHMP4 interaction interfaces could compensate for the strain on the filament and the membrane bending energy, the net outcome would be buckling of an otherwise planar membrane [60]. Strong interactions between CHMP4 and lipids might form the basis of the fencing by reducing lipid diffusion. To induce membrane buckling, polymer sliding must be faster than addition of new CHMP4 subunits. The large CHMP4 polymers resistant to bending [61], however, might not be able to reduce the membrane neck to ~3 nm, a precondition for spontaneous fission [80].

A second variant of the constriction model stipulates the need of two Snf7 (CHMP4) filaments, nucleated and coordinated by the two copies of ESCRT-II Vps25, closing onto each other and inducing membrane buckling by sliding (Figure 4b) [60].

Although the GUV model excludes an active role of Vps4 in ESCRT-III-catalyzed membrane fission [76,78], a third variant includes an active function for VPS4. VPS4-mediated removal of CHMP protomers from polymers might lead to shrinking of the polymer diameter, thereby resulting in membrane buckling if the lipid flow across the CHMP fence is restricted (Figure 4c). In summary, all three polymer coiling models suggest an additional function for CHMP4 beyond its role in membrane fission [76], including defining the size of the membrane patch that becomes a vesicle [60,71] or determining the virus budding site [27].

Membrane constriction by a polymer scaffold

Based on the dome-shaped copolymeric structure formed by CHMP2A and CHMP3 (Figure 3e and f) and its ability to recruit lipid membranes via its outer surface, we previously proposed that the formation of a CHMP2A–CHMP3 protein dome within the membrane neck of a bud could act as a scaffold for sculpting a wide membrane neck into a thin neck allowing spontaneous fission [58] (Figure 4d). This qualitative model was subjected to modeling scrutiny [65] demonstrating that for certain CHMP–membrane affinities and a membrane area comparable to the size of the intraluminal vesicles (~100 nm in diameter and smaller), the postfission state was energetically more favorable than the prefission state. For the prefission state, two quasi-equilibrium membrane configurations were discovered, one with a wide membrane neck (>20 nm) and the other with a narrow membrane neck (~3 nm). The energy of the narrow configuration progressively decreases with increasing CHMP–membrane affinity and for a critical CHMP–membrane affinity the narrow neck becomes more stable than the wide neck. The narrow neck then undergoes spontaneous fission and according to calculations fast fission occurs at neck radii of ~3 nm or less [80]. This indicates that the CHMP2A–CHMP3 dome-like polymers building up inside a membrane neck could catalyze membrane fission [65]. The result of membrane reshaping by the CHMP2A–CHMP3 dome could be viewed as scaffold-induced accumulation of elastic stress within the membrane neck which is released upon scission. It is tempting to speculate that if the scaffold, which holds the membrane in a stressed state, was to be abruptly removed (e.g. by the action of VPS4), the narrow membrane neck could relax either by reverting back to the wide neck or more interestingly by scission at an even faster rate. However, yeast Vps24 (CHMP3), Vps2 (CHMP2A) and Vps4 (VPS4) were not critically required for vesicle release in the GUV system employing yeast proteins [76,78].

Concluding remarks

Since its discovery, great progress has been made in deciphering the ESCRT machinery and its ability to catalyze receptor downregulation. The most important molecular players have been identified and structural biology provided a comprehensive picture of soluble complexes and sub-complexes. We have learned that ESCRT are the minimal vesicle budding machinery employed to sort receptors into vesicles at the endosomal membrane, whereas subsets of ESCRT act during cytokinesis and budding of some

Box 2. Outstanding questions

Although we know that ESCRT-0 concentrates ubiquitylated cargo, little is known about the spatial and temporal organization of ESCRT-0 and how decisions of recycling or degradation are made. Moreover, although ESCRT-I and -II are involved in vesicle formation, we do not yet understand how these complexes might adopt specific structures that can deform membranes into vesicles with species-specific uniform sizes. Because virus budding and cytokinesis recruit ESCRT-I but not -II, we do not fully understand their individual functions in membrane remodeling. ESCRT-I, for example, interacts with membranes, but does not deform membranes. Thus, what is its role in the absence of ESCRT-II? Further important questions concern ESCRT-III. How is ESCRT-III polymerization induced in the absence of ESCRT-II and the ESCRT-III protein CHMP6? Can the ESCRT-associated factor ALIX compensate for this ESCRT-II function in its dimeric state *in vivo*? Finally, the big question is what is the structure of ESCRT-III *in vivo*? How does it sculpt membranes and how does it provide the energy required for membrane fission if VPS4 is only responsible for recycling? A combination of high resolution imaging, cellular electron tomography and single molecule approaches employing membrane model systems are likely to provide some answers to these questions in the future.

enveloped viruses. ESCRT-III and VPS4 are central players in all ESCRT-catalyzed processes and implicated in membrane fission and complex recycling. A common emerging theme is the assembly of an ESCRT-III polymer at or inside the neck of a budding vesicle and virus or at the midbody leading to membrane constriction and fission. Although several potential theoretical models have been brought forward, they all require rigorous testing. Thus, regardless of the exciting progress that has been achieved in recent years to obtain insight into ESCRT function, the ESCRT future will be equally exciting because many questions remain to be answered (Box 2) to understand the fine-tuning of ESCRTing during normal cellular and pathological functions.

Acknowledgements

We thank M. Kozlov for critical reading of the manuscript and apologize to all authors whose work could not be cited owing to space limitations. Research in the Weissenhorn lab is supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0271-01) and a program grant from Deutsche Forschungsgemeinschaft SPP1175. S.L. is supported by a Human Frontier Science Program long-term postdoctoral fellowship, P.M. is supported by a postdoctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and N.M. by a predoctoral fellowship from the Rhône-Alpes program Cluster 10 Infectiologie.

References

- Woodman, P.G. and Futter, C.E. (2008) Multivesicular bodies: coordinated progression to maturity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 408–414
- Saksena, S. *et al.* (2007) ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* 32, 561–573
- Raiborg, C. and Stenmark, H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445–452
- Williams, R.L. and Urbe, S. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 355–368
- Hurley, J.H. *et al.* (2009) Piecing together the ESCRTs. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 161–166
- Falguieres, T. *et al.* (2009) Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp. Cell Res.* 315, 1567–1573
- McDonald, B. and Martin-Serrano, J. (2009) No strings attached: the ESCRT machinery in viral budding and cytokinesis. *J. Cell Sci.* 122, 2167–2177
- Urwin, H. *et al.* (2009) The role of CHMP2B in frontotemporal dementia. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 208–212
- Schu, P.V. *et al.* (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 260, 88–91
- Stahelin, R.V. *et al.* (2002) Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J. Biol. Chem.* 277, 26379–26388
- Teo, H. *et al.* (2006) ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes. *Cell* 125, 99–111
- Ren, X. *et al.* (2009) Hybrid structural model of the complete human ESCRT-0 complex. *Structure* 17, 406–416
- Kostelansky, M.S. *et al.* (2007) Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* 129, 485–498
- Im, Y.J. and Hurley, J.H. (2008) Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex. *Dev. Cell* 14, 902–913
- Gonciarz, M.D. *et al.* (2008) Biochemical and structural studies of yeast Vps4 oligomerization. *J. Mol. Biol.* 384, 878–895
- Landsberg, M.J. *et al.* (2009) Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure* 17, 427–437
- Teis, D. *et al.* (2008) Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* 15, 578–589
- Ren, X. and Hurley, J.H. (2010) VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *EMBO J.* 29, 1045–1054
- Komander, D. *et al.* (2009) Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 550–563
- Morita, E. and Sundquist, W.I. (2004) Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 395–425
- Bieniasz, P.D. (2006) Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 344, 55–63
- Hartlieb, B. and Weissenhorn, W. (2006) Filovirus assembly and budding. *Virology* 344, 64–70
- Usami, Y. *et al.* (2009) The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 181–184
- Usami, Y. *et al.* (2008) Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase. *J. Virol.* 82, 4898–4907
- Chung, H.Y. *et al.* (2008) NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPX late domains. *J. Virol.* 82, 4884–4897
- Pineda-Molina, E. *et al.* (2006) The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic* 7, 1007–1016
- Carlson, L.A. *et al.* (2008) Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host Microbe* 4, 592–599
- Chen, B.J. and Lamb, R.A. (2008) Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* 372, 221–232
- Uteley, T.J. *et al.* (2008) Respiratory syncytial virus uses a Vps4-independent budding mechanism controlled by Rab11-FIP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10209–10214
- Carlton, J.G. and Martin-Serrano, J. (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908–1912
- Morita, E. *et al.* (2007) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J.* 26, 4215–4227
- Lee, H.H. *et al.* (2008) Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science* 322, 576–580
- Steigemann, P. and Gerlich, D.W. (2009) Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody. *Trends Cell Biol.* 19, 606–616
- Dukes, J.D. *et al.* (2008) A dominant-negative ESCRT-III protein perturbs cytokinesis and trafficking to lysosomes. *Biochem. J.* 411, 233–239
- Morita, E. *et al.* (2010) Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12889–12894

- 36 Agromayor, M. *et al.* (2009) Essential role of hIST1 in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1374–1387
- 37 Bajorek, M. *et al.* (2009) Biochemical analyses of human IST1 and its function in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 1360–1373
- 38 Sagona, A.P. *et al.* (2010) PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat. Cell Biol.* 12, 362–371
- 39 Hutchins, J.R. *et al.* (2010) Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science* 328, 593–599
- 40 Nakamura, A. *et al.* (2009) Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement. *J. Cell Biol.* 187, 607–614
- 41 Lindas, A.C. *et al.* (2008) A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18942–18946
- 42 Samson, R.Y. *et al.* (2008) A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* 322, 1710–1713
- 43 Babst, M. *et al.* (2002) ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev. Cell* 3, 271–282
- 44 Carlton, J.G. *et al.* (2008) Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10541–10546
- 45 Rue, S.M. *et al.* (2008) Novel Ist1–Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting. *Mol. Biol. Cell* 19, 475–484
- 46 Dimaano, C. *et al.* (2008) Ist1 regulates vps4 localization and assembly. *Mol. Biol. Cell* 19, 465–474
- 47 Lee, J.A. *et al.* (2009) Autophagy defects contribute to neurodegeneration induced by dysfunctional ESCRT-III. *Autophagy* 5, 1070–1072
- 48 Belly, A. *et al.* (2010) CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J. Cell Sci.* 123, 2943–2954
- 49 Mahul-Mellier, A.L. *et al.* (2009) Alix and ALG-2 make a link between endosomes and neuronal death. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 200–203
- 50 Doyotte, A. *et al.* (2008) The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6308–6313
- 51 Zamborlini, A. *et al.* (2006) Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19140–19145
- 52 Shim, S. *et al.* (2007) Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain. *Traffic* 8, 1068–1079
- 53 Lata, S. *et al.* (2008) Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J. Mol. Biol.* 378, 818–827
- 54 Bajorek, M. *et al.* (2009) Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 754–762
- 55 Lin, Y. *et al.* (2005) Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1. *J. Biol. Chem.* 280, 12799–12809
- 56 Muziol, T. *et al.* (2006) Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell* 10, 821–830
- 57 Xiao, J. *et al.* (2009) Structural basis of Ist1 function and Ist1–Did2 interaction in the multivesicular body pathway and cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 20, 3514–3524
- 58 Lata, S. *et al.* (2008) Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 321, 1354–1357
- 59 Saksena, S. *et al.* (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136, 97–109
- 60 Teis, D. *et al.* (2010) ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation. *EMBO J.* 29, 871–883
- 61 Pires, R. *et al.* (2009) A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17, 843–856
- 62 Lenz, M. *et al.* (2009) Membrane buckling induced by curved filaments. *Phys. Rev. Lett.* 103, 038101
- 63 Hanson, P.I. *et al.* (2008) Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180, 389–402
- 64 Ghazi-Tabatabai, S. *et al.* (2008) Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24. *Structure* 16, 1345–1356
- 65 Fabrikant, G. *et al.* (2009) Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000575
- 66 Scott, A. *et al.* (2005) Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J.* 24, 3658–3669
- 67 Azmi, I.F. *et al.* (2008) ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Dev. Cell* 14, 50–61
- 68 Shestakova, A. *et al.* (2010) Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III. *Mol. Biol. Cell* 21, 1059–1071
- 69 Xiao, J. *et al.* (2008) Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway. *Dev. Cell* 14, 37–49
- 70 Yu, Z. *et al.* (2008) Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *J. Mol. Biol.* 377, 364–377
- 71 Nickerson, D.P. *et al.* (2010) Regulators of vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles. *Mol. Biol. Cell* 21, 1023–1032
- 72 Stuchell-Brereton, M.D. *et al.* (2007) ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature* 449, 740–744
- 73 Obita, T. *et al.* (2007) Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature* 449, 735–739
- 74 Kieffer, C. *et al.* (2008) Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev. Cell* 15, 62–73
- 75 Yang, D. *et al.* (2008) Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1278–1286
- 76 Wollert, T. and Hurley, J.H. (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864–869
- 77 Im, Y.J. *et al.* (2009) Structure and function of the ESCRT-II–III interface in multivesicular body biogenesis. *Dev. Cell* 17, 234–243
- 78 Wollert, T. *et al.* (2009) Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* 458, 172–177
- 79 Hanson, P.I. *et al.* (2009) Cell biology of the ESCRT machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 568–574
- 80 Kozlovsky, Y. and Kozlov, M.M. (2003) Membrane fission: model for intermediate structures. *Biophys. J.* 85, 85–96
- 81 Mizushima, N. and Levine, B. (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 12, 823–830
- 82 Mettlen, M. *et al.* (2009) Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1022–1026
- 83 Sato, Y. *et al.* (2008) Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 455, 358–362
- 84 Gill, D.J. *et al.* (2007) Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* 26, 600–612
- 85 Fisher, R.D. *et al.* (2007) Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128, 841–852
- 86 Lee, S. *et al.* (2007) Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 194–199
- 87 Julicher, F. and Lipowsky, R. (1993) Domain-induced budding of vesicles. *Phys. Rev. Lett.* 70, 2964–2967
- 88 Yorikawa, C. *et al.* (2005) Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting. *Biochem. J.* 387, 17–26
- 89 Bowers, K. *et al.* (2004) Protein–protein interactions of ESCRT complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 5, 194–210
- 90 McCullough, J. *et al.* (2008) ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7687–7691
- 91 Ichioka, F. *et al.* (2008) Brox, a novel farnesylated Bro1 domain-containing protein that associates with charged multivesicular body protein 4 (CHMP4). *FEBS J.* 275, 682–692
- 92 Odorizzi, G. *et al.* (2003) Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 116, 1893–1903
- 93 Weiss, P. *et al.* (2009) Analysis of the dual function of the ESCRT-III protein Snf7 in endocytic trafficking and in gene expression. *Biochem. J.* 424, 89–97
- 94 Kim, J. *et al.* (2005) Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain. *Dev. Cell* 8, 937–947
- 95 Horii, M. *et al.* (2006) CHMP7, a novel ESCRT-III-related protein, associates with CHMP4b and functions in the endosomal sorting pathway. *Biochem. J.* 400, 23–32
- 96 Yorikawa, C. *et al.* (2008) Human calpain 7/PalBH associates with a subset of ESCRT-III-related proteins in its N-terminal region and

- partly localizes to endocytic membrane compartments. *J. Biochem.* 143, 731–745
- 97 Row, P.E. *et al.* (2007) The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 30929–30937
- 98 Nickerson, D.P. *et al.* (2006) Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J. Cell Biol.* 175, 715–720
- 99 Rodriguez-Galan, O. *et al.* (2009) Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J. Biol. Chem.* 284, 4404–4412
- 100 Doring, T. *et al.* (2010) gamma2-Adaptin is functioning in the late endosomal sorting pathway and interacts with ESCRT-I and -III subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 1252–1264
- 101 Spitzer, C. *et al.* (2009) The ESCRT-related CHMP1A and B proteins mediate multivesicular body sorting of auxin carriers in *Arabidopsis* and are required for plant development. *Plant Cell* 21, 749–766
- 102 Agromayor, M. and Martin-Serrano, J. (2006) Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo. *J. Biol. Chem.* 281, 23083–23091
- 103 Ward, D.M. *et al.* (2010) The role of LIP5 and CHMP5 in multivesicular body formation and HIV-1 budding in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 280, 10548–10555
- 104 Renvoise, B. *et al.* (2010) SPG20 protein spartin is recruited to midbodies by ESCRT-III protein Ist1 and participates in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 21, 3293–3303
- 105 Tanaka, H. *et al.* (2002) Vps4-A (vacuolar protein sorting 4-A) is a binding partner for a novel Rho family GTPase, Rnd2. *Biochem. J.* 365, 349–353
- 106 Lottridge, J.M. *et al.* (2006) Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 6202–6207
- 107 Boone, M. *et al.* (2010) The lysosomal trafficking regulator interacting protein-5 localizes mainly in epithelial cells. *J. Mol. Histol.* 41, 61–74
- 108 Shiflett, S.L. *et al.* (2004) Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 10982–10990

BIBLIOGRAPHIE

A.

Anderson RG, Brown MS, Goldstein JL. (1977) Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts., *Cell.*, 10(3):351-64.

Asao, H., Sasaki, Y., Arita, T., Tanaka, N., Endo, K., Kasai, H., Takeshita, T., Endo, Y., Fujita, T., and Sugamura, K. (1997). Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule - Its suppressive effect on cytokine induced cell growth. *J. Biol. Chem.* 272, 32785–32791.

Azmi IF, Davies BA, Xiao J, Babst M, Xu Z, Katzmann DJ., (2008), ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1., *Dev Cell*, 14:50–61.

B.

Babst M., Katzmann D.J., Snyder W.B., Wendland B., and Emr S.D., (2002), Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body, *Developmental Cell*, 3(2) 283-289

Babst M., Katzmann D.J., Estepa-Sabal E.J., Meerloo T. and Emr S.D., (2002), Escrt-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting, *Developmental Cell*, 3(2) 271-282

Babst M, Davies BA, Katzmann DJ., (2011), Regulation of Vps4 During MVB Sorting and Cytokinesis., *Traffic*, 10.1111/j.1600-0854.2011.01230.x

Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003a). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* 162, 435–442.

Bache, K.G., Raiborg, C., Mehlum, A., and Stenmark, H. (2003b). STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J. Biol. Chem.* 278, 12513–12521.

Bainton DF. (1981), The discovery of Lysosomes, *J Cell Biol.*, 91(3 Pt 2):66s-76s.

Bajorek M, Schubert HL, McCullough J, Langelier C, Eckert DM, Stubblefield WM, Uter NT, Myszka DG, Hill CP, Sundquist WI., (2009), Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition., *Nat Struct Mol Biol.* 16(7):754-62.

Banner, D.W., Kokkinidis, M., Tsernoglou, D., (1987), Structure of the ColE1 rop protein at 1.7Å resolution., *J.Mol.Biol.* 196: 657-675

Barr FA, Gruneberg U., (2007), Cytokinesis: placing and making the final cut., *Cell*.131(5):847-60.

Basel-Vanagaite L, Attia R, Yahav M, Ferland RJ, Anteki L, Walsh CA, Olender T, Straussberg R, Magal N, Taub E, Drasinover V, Alkelai A, Bercovich D, Rechavi G, Simon AJ, Shohat M., (2006), The CC2D1A, a member of a new gene family with C2 domains, is involved in autosomal recessive non-syndromic mental retardation., *J Med Genet.*;43(3):203-10.

Bassereau P., (2010), Division of labour in ESCRT complexes, *Nature Cell Biology*, 12, 422 - 423

Battye T.G.G., Kontogiannis L., Johnson O., Powell H.R. and Leslie A.G.W., (2011), iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM *Acta Cryst. D*67, 271-281

Baumgärtel V, Ivanchenko S, Dupont A, Sergeev M, Wiseman PW, Kräusslich HG, Bräuchle C, Müller B, Lamb DC., (2011), Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component., *Nat Cell Biol.* (4):469-74.

Belly A, Bodon G, Blot B, Bouron A, Sadoul R, Goldberg Y., (2010), CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines., *J Cell Sci.*, 123(Pt 17):2943-54

Belly A, Bodon G, Blot B, Bouron A, Sadoul R, Goldberg Y., (2010), CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines., *J Cell Sci.*, 123(Pt 17):2943-54.

Boura E., Różycki B., Herrick D.Z., Chung H.S., Vecer J., Eaton W.A., Cafiso D.S., Hummer G., and Hurley J.H., (2011), Solution structure of the ESCRT-I complex by smallangle X-ray scattering, EPR, and FRET spectroscopy, *PNAS*, 108(22)

Bowers K., Lottridge J., Helliwell S.B., Goldthwaite L.M., Luzio J.P., Stevens H.T., (2004) Protein-Protein Interactions of ESCRT Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Traffic*, 5(3), 194–210

Bruce EA, Medcalf L, Crump CM, Noton SL, Stuart AD, Wise HM, Elton D, Bowers K, Digard P., (2009), Budding of filamentous and non-filamentous influenza A virus occurs via a VPS4 and VPS28-independent pathway., *Virology*, 390(2):268-78

Bryant PJ, Schubiger G., (1971), Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*., *Dev Biol.*, 24(2):233-63.

Bryant PJ, Levinson P., (1985), Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila*, and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth., *Dev Biol.*;107(2):355-63.

Bryant, P.J., Watson, K.L., Justice, R.W., Woods, D.F., (1993), Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in *Drosophila*. *Dev. Suppl.*, 239–249.

Buratovich MA, Bryant PJ., (1995), Duplication of l(2)gd imaginal discs in *Drosophila* is mediated by ectopic expression of wg and dpp., *Dev Biol.*, 168(2):452-63.

Buratovich MA, Bryant PJ., (1997), Enhancement of overgrowth by gene interactions in lethal(2)giant discs imaginal discs from *Drosophila melanogaster*., *Genetics*. 147(2):657-70.

C.

Carlton, J. G., Agromayor, M. & Martin-Serrano, J. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release., (2008), *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 10541–10546

Chang CH, Lai LC, Cheng HC, Chen KR, Syue YZ, Lu HC, Lin WY, Chen SH, Huang HS, Shiau AL, Lei HY, Qin J, Ling P., (2011), TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE) is an innate immune regulator modulating the TLR3 and TLR4 signaling pathways., *J Biol Chem.*, 286(9):7043-51

Chazal N, Gerlier D., (2003), Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts., *Microbiol Mol Biol Rev.*, 67(2):226-37

Childress JL, Acar M, Tao C, Halder G., (2006), Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis., *Curr Biol.*;16(22):2228-33.

Chu, T., Sun, J., Saksena, S. & Emr, S. D. (2006) New component of ESCRT-I regulates endosomal sorting complex assembly. *J. Cell Biol.* **175**, 815–823

Chung HY, Morita E, von Schwedler U, Müller B, Kräusslich HG, Sundquist WI., (2008), NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPXL late domains., *J Virol.*, 82(10):4884-97

Cowtan, K. (1994). Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on protein crystallography, 31, 34-38

Cowtan, K., (2006), The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains, *Acta Cryst.D*62, 1002-1011

Curtiss, M., Jones, C. & Babst, M., (2006) Efficient cargo sorting by ESCRT-I and the subsequent release of ESCRT-I from multivesicular bodies requires the subunit Mvb12. *Mol. Biol. Cell* **18**, 636–645

Coonrod M.E. and Stevens T.H., (2010), The Yeast vps Class E Mutants: The Beginning of the Molecular Genetic Analysis of Multivesicular Body Biogenesis, *Molecular Biology of the Cell*, 21, 4057–4060

D.

Da Q, Yang X, Xu Y, Gao G, Cheng G, Tang H., (2011), TANK-binding kinase 1 attenuates PTAP-dependent retroviral budding through targeting endosomal sorting complex required for transport-I., *J Immunol.*, 186(5):3023-30.

de Duve, C., Wattiaux R., (1966), Functions of lysosomes., *Annu. Rev. Physiol.* 28 :435-492.

Demirov, D. G., Ono, A., Orenstein, J. M. & Freed, E. O., (2002), Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 955–960.

Demirov, D. G., Orenstein, J. M. & Freed, E. O., (2002). The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell typedependent manner. *J. Virol.* 76, 105–117.

Deng HX, Chen W, Hong ST, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance MA, Siddique T., (2011), Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia., *Nature*, doi: 10.1038/nature10353.

Dimaano C, Jones CB, Hanono A, Curtiss M, Babst M., (2008), Ist1 regulates Vps4 localization and assembly., *Mol Biol Cell.*, 19(2):465-74

Di Paolo G, De Camilli P., (2006), Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics., *Nature.*;443(7112):651-7.

Doyotte A., Mironov A. , McKenzie E., Woodman P., (2008), The Bro1-related protein HD-PTP/PTPN23 is required for endosomal cargo sorting and multivesicular body morphogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(17): 6308–6313.

E.

Elia N, Sougrat R, Spurlin TA, Hurley JH, Lippincott-Schwartz J., Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission., (2011), *PNAS*, 108(12):4846-51

Evans P., (2006) Scaling and assessment of data quality., *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*62(Pt 1):72-82

F.

Fabrikant G, Lata S, Riches JD, Briggs JA, Weissenhorn W, Kozlov MM., (2009), Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III., *PLoS Comput Biol.*, 5(11):e1000575

Fader CM, Colombo MI., (2009), Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners., *Cell Death Differ.* 16(1):70-8.

Ferré-D'Amaré AR, Pognonec P, Roeder RG, Burley SK., (1994), Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF., *EMBO J.*, 13(1):180-9.

Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP., (2007), Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128, 841–852

Field, M. C., Gabernet-Castello, C. & Dacks, J. B., (2007) In *Origins and Evolution of Eukaryotic Endomembranes and Cytoskeleton* (ed. Jékely, G.) (Landes Bioscience, Austin).

Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A. (2007), Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease., *J Cell Biol.*, 179(3):485-500.

Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP. (2007), Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* 128, 841–852

Freed, E. O. Viral late domains. *J. Virol.* **76**, 4679–4687 (2002).

Fuchs E, Haas AK, Spooner RA, Yoshimura S-I, Lord JM, Barr FA. (2007) Specific Rab GTPase-activating proteins define the Shiga toxin and epidermal growth factor uptake pathways. *J Cell Biol.*, 177:1133-1143.

Fyfe I, Schuh AL, Edwardson JM, Audhya A. (2011), Association of the endosomal sorting complex ESCRT-II with the Vps20 subunit of ESCRT-III generates a curvature-sensitive complex capable of nucleating ESCRT-III filaments., *J Biol Chem.*,286(39):34262-70.

G.

Gallagher CM, Knoblich JA. (2006), The conserved c2 domain protein lethal (2) giant discs regulates protein trafficking in *Drosophila*., *Dev Cell.*;11(5):641-53.

Garrus J.E., von Schwedler U.K., Pornillos O.W., Morham S.G., Zavitz K.H., Wang H.E., Wettstein D.A., Stray K.M., Côté M., Rich R.L., Myszka D.G. and Sundquist W.I., Tsg101 and the Vacuolar Protein Sorting Pathway Are Essential for HIV-1 Budding, (2001), *Cell*, 107(1) 55-65

Gill DJ, Teo H, Sun J, Perisic O, Veprintsev DB, Emr SD, Williams RL. (2007), Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J.* **26**, 600–612

Ghazi-Tabatabai S, Saksena S, Short JM, Pobbati AV, Veprintsev DB, Crowther RA, Emr SD, Egelman EH, Williams RL. (2008), Structure and disassembly of filaments formed by the ESCRT-III subunit Vps24., *Structure*, 16(9):1345-56.

Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. (1979) Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis., *Nature.*, 279(5715):679-85.

Gonciarz MD, Whitby FG, Eckert DM, Kieffer C, Heroux A, Sundquist WI, Hill CP. (2008), Biochemical and structural studies of yeast Vps4 oligomerization., *J Mol Biol.*, 384(4):878-95

Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc.Natl Acad. Sci. USA*, 88, 3195–3199.

Grishin, N.V. (2010). Assessment of Free Modeling in CASP9 Experiment. In The 9th Community Wide Experiment on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction

Guerrero-Valero M, Ferrer-Orta C, Querol-Audí J, Marin-Vicente C, Fita I, Gómez-Fernández JC, Verdaguer N, Corbalán-García S, (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂., 106(16):6603-7

Guizetti J, Schermelleh L, Mántler J, Maar S, Poser I, Leonhardt H, Müller-Reichert T, Gerlich DW., (2011), Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments., Science, 331(6024):1616-20.

H.

Hadjighassem MR, Galaraga K, Albert PR., (2011), Freud-2/CC2D1B mediates dual repression of the serotonin-1A receptor gene., Eur J Neurosci.;33(2):214-23. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07498.x. Epub 2010 Dec 14.

Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE., (2008), Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments., J Cell Biol., 180(2):389-402.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice., (2006), Nature 441, 885–889

Hariharan IK, Bilder D., (2006), Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in Drosophila., Annu Rev Genet., 40:335-61.

Helfmann S, Neumann P, Tittmann K, Moser T, Ficner R, Reisinger E., (2011), The crystal structure of the C₂A domain of otoferlin reveals an unconventional top loop region., J Mol Biol, 406(3):479-90

Horii M, Shibata H, Kobayashi R, Katoh K, Yorikawa C, Yasuda J, Maki M., (2006), CHMP7, a novel ESCRT-III-related protein, associates with CHMP4b and functions in the endosomal sorting pathway., Biochem J.;400(1):23-32.

Huang, M., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Freed, E. O. (1995). p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. J. Virol. 69, 6810–6818.

Huang Q, Szebenyi DM., (2010), Structural basis for the interaction between the growth factor-binding protein GRB10 and the E3 ubiquitin ligase NEDD4., J Biol Chem, 285(53):42130-9

Hurley, J.H., and Misra, S. (2000). Signaling and subcellular targeting by membrane-binding domains. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 49–79.

Hurley JH, Boura E, Carlson LA, Rózycki B., (2010), Membrane budding., Cell. 10;143(6):875-87

Hurley J.H., Hanson P.I., (2010) Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck, Nat Rev Mol Cell Biol. (8):556-66.

I.

Im Y.J., Kuo L, Ren X, Burgos PV, Zhao XZ, Liu F, Burke TR Jr, Bonifacino JS, Freed EO, Hurley JH., (2010), Structure, Crystallographic and functional analysis of the ESCRT-I /HIV-1 Gag PTAP interaction., *18*, 1536–1547

Im Y.J., Wollert T., Boura E.: Hurley J.H., (2009), Structure and Function of the ESCRT-II-III Interface in Multivesicular Body Biogenesis, *Developmental Cell*, *17*(2), 234-243

Im Y.J., Hurley J.H., (2008), Integrated Structural Model and Membrane Targeting Mechanism of the Human ESCRT-II Complex, *Developmental Cell*, *14*(6), 902-913

J.

Jadwin, J. A., Rudd, V., Sette, P., Challa, S. & Bouamr, F., (2010), Late domain-independent rescue of a release-deficient Moloney murine leukemia virus by the ubiquitin ligase itch. *J. Virol.* **84**, 704–715

Jaekel R, Klein T., (2006), The Drosophila Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking., *Dev Cell.* *11*(5):655-69.

Jekely, G., and Rorth, P. (2003). Hrs mediates downregulation of multiple signalling receptors in Drosophila. *EMBO Rep.* *4*, 1163–1168.

Johnson DC, Baines JD., (2011), Herpesviruses remodel host membranes for virus egress., *Nat Rev Microbiol.*, *9*(5):382-94.

Joung SM, Park ZY, Rani S, Takeuchi O, Akira S, Lee JY., (2011), Akt contributes to activation of the TRIF-dependent signaling pathways of TLRs by interacting with TANK-binding kinase 1., *J Immunol.*, *186*(1):499-507

Jouvenet N, Simon SM, Bieniasz PD., (2011), Visualizing HIV-1 Assembly., *J Mol Biol.*, *410*(4):501-11.

Jouvenet N, Zhadina M, Bieniasz PD, Simon SM., (2011), Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly., *Nat Cell Biol.*, *13*(4):394-401

K.

Kato M, Miyazawa K, Kitamura N., (2000) A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP., *J Biol Chem.*, *275*(48):37481-7.

Katzmann D.J., Babst M. and Emr S.D., (2001), Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I, *Cell*, 106(2), 145-155

Kieffer C, Skalicky JJ, Morita E, De Domenico I, Ward DM, Kaplan J, Sundquist WI., (2008), Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding., *Dev Cell.*;15(1):62-73.

Kozin M. & Svergun D.I. (2000) Automated matching of high- and low-resolution structural models *J Appl Cryst.* 34, 33-41.

Klein T., (2003), The tumour suppressor gene *l(2)giant discs* is required to restrict the activity of Notch to the dorsoventral boundary during *Drosophila* wing development., *Dev Biol.*;255(2):313-33.

Kostelansky MS, Schluter C, Tam YY, Lee S, Ghirlando R, Beach B, Conibear E, Hurley JH. (2007) Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell* **129**, 485–498

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice., (2006), *Nature* 441, 880–884

L.

Landsberg MJ, Vajjhala PR, Rothnagel R, Munn AL, Hankamer B., (2009), Three-dimensional structure of AAA ATPase Vps4: advancing structural insights into the mechanisms of endosomal sorting and enveloped virus budding. *Structure*, 17:427–437.

Langelier C, von Schwedler UK, Fisher RD, De Domenico I, White PL, Hill CP, Kaplan J, Ward D, Sundquist WI. (2006), Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release. *J. Virol.* 80, 9465–9480

Lata S, Roessle M, Solomons J, Jamin M, Gottlinger HG, Svergun DI, Weissenhorn W., (2008), Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3., *J Mol Biol.*, 378(4):818-27

Lata S, Schoehn G, Jain A, Pires R, Piehler J, Gottlinger HG, Weissenhorn W., (2008b), Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4, *321(5894):1354-7.*

Lee, S., Joshi, A., Nagashima, K., Freed, E. O. & Hurley, J. H., (2007), Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**, 194–199

Lee, JA., Beigneux, A., Ahmad, S. T., Young, S. G. And Gao, F. B., (2007), ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr. Biol.* 17, 1561-1567

Lee JA, Gao FB., (2008), ESCRT, autophagy, and frontotemporal dementia., *BMB Rep.*, 41(12):827-32.

Lee JA, Gao FB., (2009), Inhibition of autophagy induction delays neuronal cell loss caused by dysfunctional ESCRT-III in frontotemporal dementia., *J Neurosci.*, 29(26):8506-11.

Lemmon, M.A., (2003), Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4, 201–213

Lemmon M.A., (2008), Membrane recognition by phospholipid-binding domains., *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9(2):99-111.

Lenz M, Crow DJ, Joanny JF., (2009), Membrane buckling induced by curved filaments., *Phys Rev Lett.*, 103(3):038101

Lin Y, Kimpler LA, Naismith TV, Lauer JM, Hanson PI., (2005), Interaction of the mammalian endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) III protein hSnf7-1 with itself, membranes, and the AAA+ ATPase SKD1., *J Biol Chem.*, 280(13):12799-809

Lottridge JM, Flannery AR, Vincelli JL, Stevens TH., (2006), Proc Natl Acad Sci USA, Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body., 103(16):6202-7

M.

Makarova KS, Yutin N, Bell SD, Koonin EV., (2010), Evolution of diverse cell division and vesicle formation systems in Archaea., *Nat Rev Microbiol.*, ;8(10):731-41.

Mari M, Griffith J, Rieter E, Krishnappa L, Klionsky DJ, Reggiori F., (2010), An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis., *J Cell Biol.*, 190(6):1005-22.

Martin-Serrano, J., Zang, T. & Bieniasz, P. D., (2001), HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7, 1313–1319.

Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D. & Bieniasz, P. D. (2003). Divergent retroviral late budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 12414–12419.

Martin-Serrano J., Zang T., Bieniasz P.D., (2003), Role of ESCRT-I in Retroviral Budding, *Journal of Virology*, 77(8) 4794–4804

Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W. & Bieniasz, P. D. (2005), HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPxY motifs to the vacuolar protein sorting pathway. *J. Cell Biol.* 168, 89–101.

Martin-Serrano J, Neil SJ., (2011), Host factors involved in retroviral budding and release., *Nat Rev Microbiol.*,9(7):519-31.

Mayers J.R., Fyfe I, Schuh A.L., Chapman E.R., Edwardson J.M., Audhya A., (2011), ESCRT-0 Assembles as a Heterotetrameric Complex on Membranes and Binds Multiple Ubiquitylated Cargoes Simultaneously, *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 9636-9645.

McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J., (2007), Phaser crystallographic software, *J. Appl. Cryst.*, 40, 658-674

Merrill SA, Hanson PI. (2010) Activation of human VPS4A by ESCRT-III proteins reveals ability of substrates to relieve enzyme autoinhibition., *J Biol Chem*, 285:35428–35438

Miele L. (2006), Notch signaling., *Clin Cancer Res.*;12(4):1074-9.

Moberg, K.H., Schelble, S., Burdick, S.K., and Hariharan, I.K. (2005)., Mutations in erupted, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumour susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev. Cell* 9, 699–710.

Moriscot C, Gribaldo S, Jault JM, Krupovic M, Arnaud J, Jamin M, Schoehn G, Forterre P, Weissenhorn W, Renesto P. (2011), Crenarchaeal CdvA Forms Double-Helical Filaments Containing DNA and Interacts with ESCRT-III-Like CdvB., *PLoS One*, 6(7):e21921.

Morita E, Sandrin V, Chung HY, Morham SG, Gygi SP, Rodesch CK, Sundquist WI. (2007) Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* 26:4215–4227.

Morita E, Colf LA, Karren MA, Sandrin V, Rodesch CK, Sundquist WI. (2010), Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107:12889-94

Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI. (2011), ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding., *Cell Host Microbe.*, 9(3):235-42.

Morris, R. J., Zwart, P. H., Cohen, S., Fernandez, F. J., Kakaris, M., Kirillova, O., Vonrhein, C., Perrakis, A. & Lamzin, V. S. (2004). *J. Synchr. Rad.* 11, 56-59.

Murre C, McCaw PS, Baltimore D. (1989), A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins., *Cell*, 56(5):777-83.

Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A. (2011), REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures, *Acta Cryst. D*67, 355-367

N.

Nair U, Jotwani A, Geng J, Gammoh N, Richerson D, Yen WL, Griffith J, Nag S, Wang K, Moss T, Baba M, McNew JA, Jiang X, Reggiori F, Melia TJ, Klionsky DJ. (2011), SNARE Proteins Are Required for Macroautophagy., *Cell.*, 146(2):290-302.

Nakamura A, Naito M, Tsuruo T, Fujita N. (2008), Freud-1/Aki1, a novel PDK1-interacting protein, functions as a scaffold to activate the PDK1/Akt pathway in epidermal growth factor signaling., *Mol Cell Biol.*, 28(19):5996-6009.

Nakamura A, Arai H, Fujita N. (2009), Centrosomal Aki1 and cohesin function in separase-regulated centriole disengagement., *J Cell Biol.*;187(5):607-14.

Nakamura A, Naito M, Arai H, Fujita N., (2010), Mitotic phosphorylation of Aki1 at Ser208 by cyclin B1-Cdk1 complex., *Biochem Biophys Res Commun.*, 393(4):872-6. Epub 2010 Feb 18.

Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y., (2007), Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion., *Cell*, 130(1):165-78.

Nalefski EA, Falke JJ., (1996), The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity., *Protein Sci.*, 5(12):2375-90.

Neumann B, Walter T, Hériché JK, Bulkescher J, Erfle H, Conrad C, Rogers P, Poser I, Held M, Liebel U, Cetin C, Sieckmann F, Pau G, Kabbe R, Wünsche A, Satagopam V, Schmitz MH, Chapuis C, Gerlich DW, Schneider R, Eils R, Huber W, Peters JM, Hyman AA, Durbin R, Pepperkok R, Ellenberg J., (2010), Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes., *Nature*, 464(7289):721-7.

O.

Obita T, Saksena S, Ghazi-Tabatabai S, Gill DJ, Perisic O, Emr SD, Williams RL., (2007), Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4. *Nature*, 449:735–739.

Oestreich, A. J., Davies, B. A., Payne, J. A. & Katzmann, D. J. (2006) Mvb12 is a novel member of ESCRT-I involved in cargo selection by the multivesicular body pathway. *Mol. Biol. Cell* **18**, 646–657

Otwinowski, Z. (1991), Isomorphous replacement and anomalous scattering. Proceedings of the CCP4 study weekend, January 25–26, 1991 (eds Wolf, W., Evans, P.R. & Leslie, A.G.W.) 80–85

Ou XM, Lemonde S, Jafar-Nejad H, Bown CD, Goto A, Rogaeva A, Albert PR., (2003), Freud-1: A neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene., *J Neurosci.*;23(19):7415-25

Ou YH, Torres M, Ram R, Formstecher E, Roland C, Cheng T, Brekken R, Wurz R, Tasker A, Polverino T, Tan SL, White MA., (2011), TBK1 directly engages Akt/PKB survival signaling to support oncogenic transformation., *Mol Cell.*, 18;41(4):458-70.

P.

Palencia A., Martinez J.C., Mateo P.L., Luque I., Camara-Artigas A., (2006), Structure of human TSG101 UEV domain, *Acta Cryst. D.*, 62, 458-464

Panjikar, S., Parthasarathy,V.,Lamzin,V.S.,Weiss,M. S. & Tucker, P. A.(2005).Auto-Rickshaw-Anautomatedcrystal structure determinationplatform as an efficient tool for the validation of an X-raydiffraction experiment. *Acta Cryst.D*61, 449-457.

Panjikar S., Parthasarathy, V., Lamzin, V., Weiss, M.S., Tucker, P.A.,(2009). On the combination of molecular replacement and single anomalous diffraction phasing for automated structure determination *Acta Cryst. D*65,1089-1097.

Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM; MRC Proteomics in ALS Study; FReJA Consortium., (2006), ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B)., *Neurology*.;67(6):1074-7.

Pawliczek T, Crump CM., (2009), Herpes simplex virus type 1 production requires a functional ESCRT-III complex but is independent of TSG101 and ALIX expression., *J Virol.*, 83(21):11254-64

Pires R, Hartlieb B, Signor L, Schoehn G, Lata S, Roessle M, Moriscot C, Popov S, Hinz A, Jamin M, Boyer V, Sadoul R, Forest E, Svergun DI, Göttlinger HG, Weissenhorn W., (2009), A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments., *Structure*, 17(6):843-56.

Peel S, Macheboeuf P, Martinelli N, Weissenhorn W., (2011) Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission., *Trends Biochem Sci.*;36(4):199-210. Epub 2010 Oct 26.

Petoukhov M.V., Konarev P.V., Kikhney A.G., Svergun D.I. (2007) ATSAS 2.1 - towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis *J Appl Cryst.* 40, s223-s228.

Plant PJ, Yeger H, Staub O, Howard P, Rotin D., (1997), The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca²⁺-dependent plasma membrane localization., *J Biol Chem*, 272(51):32329-36.

Ponting CP, Mott R, Bork P, Copley RR., (2001), Novel protein domains and repeats in *Drosophila melanogaster*: insights into structure, function, and evolution., *Genome Res.*, 11(12):1996-2008.

Pornillos, O., Alam, S. L., Davis, D. R. & Sundquist, W. I., (2002)., *Nature Struct. Biol.*, Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein., 9, 812–817

Pornillos O, Alam SL, Rich RL, Myszka DG, Davis DR, Sundquist WI., (2002b), Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain., *EMBO J.*, ;21(10):2397-406.

R.

Raiborg C., Stenmark H., (2002) Hrs and endocytic sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Cell Struct. Funct.* 27:403–408.

Raiborg C, Bache KG, Mehlum A, Stang E, Stenmark H., (2001), Hrs recruits clathrin to early endosomes. *EMBO J.*, 20(17):5008-21.

Raiborg C, Stenmark H., (2011), A helix for the final cut., *Science*, 331(6024):1533-4.

Rauch S, Martin-Serrano J., (2011), Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding., *J Virol.*, 85(7):3546-56. Epub 2010 Dec 29.

Raymond C.K., Howald-Stevenson I., Vater C.A., and T H Stevens T.H., (1992), Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants., *Mol. Biol. Cell*, 3(12): 1389–1402.

Ren X., Kloer D.P., Kim Y.C., Ghirlando R., Layla F. Saidi L.F., Hummer G. and Hurley J.H., (2009), Hybrid Structural Model of the Complete Human ESCRT-0 Complex, 17(3): 406-416

Ren X., Hurley J.H., (2010), VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo, *EMBO J.*, 29(6): 1045–1054

Ren X., Hurley J., (2011), Structural basis for endosomal Recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast, *The EMBO Journal*, 30, 2130 - 2139

Roepstorff K., Vibo Grandal M., Henriksen L., Louise S., Knudsen J., Lerdrup M., Grøvdal L., Willumsen B.M., and van Deurs B.(2009) Differential Effects of EGFR Ligands on Endocytic Sorting of the Receptor, *Traffic*, 10(8): 1115–1127.

Rogaeva A, Albert PR., (2007), The mental retardation gene CC2D1A/Freud-1 encodes a long isoform that binds conserved DNA elements to repress gene transcription., *Eur J Neurosci*. 26(4):965-74.

Rossman J, Jing X, Leser GP, Lamb RA., (2010), Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell.*, 142:902–913.

Rothman, J. H., Howald, I., and Stevens, T. H. (1989). Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 8, 2057–2065.

Roxrud, I., Raiborg, C., Pedersen, N.M., Stang, E., and Stenmark, H. (2008). An endosomally localized isoform of Eps15 interacts with Hrs to mediate degradation of epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* 180, 1205–1218.

Roy A., Kucukural A., Zhang Y.. (2010). **I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, vol 5, 725-738**

Rozycki B., Young C. Kim Y.C., Hummer G., (2010), SAXS Ensemble Refinement of ESCRT-III CHMP3 Conformational Transitions, *Structure*, 19(1):109-16.

Rue SM, Mattei S, Saksena S, Emr SD., (2008), Novel Ist1-Did2 complex functions at a late step in multivesicular body sorting., *Mol Biol Cell.*, 19(2):475-84

Rusten, T. E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L. M., Nezis, I. P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J. P., Brech, A., Bilder, D. et al. (2007)., ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy. *Curr. Biol.* 17, 1817-1825.

Rusten TE, Stenmark H., (2009), How do ESCRT proteins control autophagy?, *J Cell Sci.*122(Pt 13):2179-83.

S.

Sagona AP, Nezis IP, Pedersen NM, Liestol K, Poulton J, Rusten TE, Skotheim RI, Raiborg C, Stenmark H. (2010), PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A9 mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol.*, 12:362-71.

Salje J, van den Ent F, de Boer P, Löwe J. (2011), Direct membrane binding by bacterial actin MreB., *Mol. Cell.*, 43(3):478-87.

Samson RY, Obita T, Freund SM, Williams RL, Bell SD. (2008), A role for the ESCRT system in cell division in archaea., *Science*, 322(5908):1710-3.

Samson RY, Obita T, Hodgson B, Shaw MK, Chong PL, Williams RL, Bell SD. (2011), Molecular and structural basis of ESCRT-III recruitment to membranes during archaeal cell division., *Mol Cell.*, 41(2):186-96

Sanchez-Bautista S, Marin-Vicente C, Gomez-Fernandez JC, Corbalan-Garcia S (2006) The C2 domain of PKC α is a Ca²⁺-dependent PtdIns(4,5)P₂ sensing domain: A new insight into an old pathway. *J Mol Biol* 362:901–914.

Sakata T, Sakaguchi H, Tsuda L, Higashitani A, Aigaki T, Matsuno K, Hayashi S. (2004), *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation., *Curr Biol.*, 14(24):2228-36.

Scita G, DiFiore PP (2009) The endocytic matrix. *Nature*, 463:464- 473

Scott A, Chung HY, Gonciarz-Swiatek M, Hill GC, Whitby FG, Gaspar J, Holton JM, Viswanathan R, Ghaffarian S, Hill CP, Sundquist WI. (2005), Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins., *EMBO J.* ;24(20):3658-69

Scott A, Gaspar J, Stuchell-Brereton MD, Alam SL, Skalicky JJ, Sundquist WI. (2005), Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain of human VPS4A. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(39):13813-8

Schneider T.R. & Sheldrick G.M. (2002), Substructure solution with SHELXD, *Acta Cryst.* (2002). D58, 1772-1779

von Schwedler U.K., Stuchell M., Müller B., Ward D.M., Chung H.Y., Morita E., Wang H.E., Davis T., He G.P., Cimbara D.M., Scott A., Kräusslich H.G., Kaplan J., Scott G. Morham S.G., Sundquist W.I. (2003), The Protein Network of HIV Budding, 114(6) 701-713

Schweisguth F. (2004), Regulation of notch signaling activity., *Curr Biol.*, 14(3):R129-38.

Sette P, Jadwin JA, Dussupt V, Bello NF, Bouamr F. (2010), The ESCRT-associated protein Alix recruits the ubiquitin ligase Nedd4-1 to facilitate HIV-1 release through the LYPXnL L domain motif., *J Virol.*, 84(16):8181-92.

Shao X, Davletov BA, Sutton RB, Slidhof TC, Rizo J. (1996). Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* Shirataki H, Kaibuchi K, Sakoda T, Kishida S, Yamaguchi T, Wada K, Miyazaki, *Science*, 273:248-25 1.

Shestakova A, Hanono A, Drosner S, Curtiss M, Davies BA, Katzmann DJ, Babst M., (2010), Assembly of the AAA ATPase Vps4 on ESCRT-III., *Mol Biol Cell.*, 21(6):1059-71.

Shields SB, et al., (2009), ESCRT ubiquitin binding domains function cooperatively during MVB cargo sorting. *J Cell Biol* 185:213–224.

Shih YL, Huang KF, Lai HM, Liao JH, Lee CS, Chang CM, Mak HM, Hsieh CW, Lin CC., (2011), The N-terminal amphipathic helix of the topological specificity factor MinE is associated with shaping membrane curvature., *PLoS One.* 2011;6(6):e21425.

Shim S, Kimpler LA, Hanson PI., (2007), Structure/function analysis of four core ESCRT-III proteins reveals common regulatory role for extreme C-terminal domain., *Traffic*, 8(8):1068-79

Slagsvold T., Aasland R., Hirano S., Bache K.G., Raiborg C., Trambaiolo D., Wakatsuki S., Stenmark H., (2005), Eap45 in Mammalian ESCRT-II Binds Ubiquitin via a Phosphoinositide-interacting GLUE Domain, 280, 19600-19606.

Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L., and Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. *Trends Cell Biol.* 16, 317–326.

Slater, R. & Bishop, N. E., (2006), Genetic structure and evolution of the Vps25 family, a yeast ESCRT-II component. *BMC Evol. Biol.* 6, 59

Sorkin A., von Zastrow M. (2009). “Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (9):609-22.

Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J. (2005) Mutations in the endosomal ESCRTIII complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.* 37, 806-808.

Stefani F, Zhang L, Taylor S, Donovan J, Rollinson S, Doyotte A, Brownhill K, Bennion J, Pickering-Brown S, Woodman P., (2011), UBAP1 Is a Component of an Endosome-Specific ESCRT-I Complex that Is Essential for MVB Sorting., *Curr Biol.*

Steigemann P, Gerlich DW., (2009), Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody., *Trends Cell Biol.*;19(11):606-16

Steinman RM Brodie SE, Cohn ZA. (1976) “Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis.”, *J Cell Biol.*, 68(3):665-87.

Steinman RM, Silver JM, Cohn ZA. (1974) **Pinocytosis in fibroblasts. Quantitative studies in vitro.** *J Cell Biol.* 63(3):949-69.

Stenmark Harald, (2009), Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 513-525

Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. & Gottlinger, H. G., (2003), AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114, 689-699

Stuchell-Breton MD, Skalicky JJ, Kieffer C, Karren MA, Ghaffarian S, Sundquist WI., (2007), ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, 449:740–744.

Stuffers S, Brech A, Stenmark H., (2009), ESCRT proteins in physiology and disease., *Exp Cell Res.*;315(9):1619-26.

Sundquist WI, Schubert HL, Kelly BN, Hill GC, Holton JM, Hill CP., (2004) Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol Cell* 13:783–789.

Sutton RB, Davletov BA, Berghuis AM, SiidhofTC, Sprang SR. (1995). Structure binding fold. 80929-938. of the first C2 domain of synaptotagmin I: A novel Ca²⁺/phospholipid, *Cell*, 80(6):929-38.

Svergun D.I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J.* 2879-2886

Svergun D.I., Barberato C. & Koch M.H.J. (1995) CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates *J. Appl. Cryst.* 28, 768-773.

Sweeney NT, Brenman JE, Jan YN, Gao FB., (2006), The coiled-coil protein shrub controls neuronal morphogenesis in *Drosophila*., *Curr Biol.*, 16(10):1006-11.

T.

Tanaka N, Kaneko K, Asao H, Kasai H, Endo Y, Fujita T, Takeshita T, Sugamura K., (1999), Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem.*, 274(27):19129-35.

Tandon R, AuCoin DP, Mocarski ES., (2009), Human cytomegalovirus exploits ESCRT machinery in the process of virion maturation., *J Virol.*, 83(20):10797-807

Teis D, Saksena S, Judson BL, Emr SD., (2010), ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation., *EMBO J.*, 29(5):871-83

Teo H, Veprintsev DB, Williams R.L. (2004) Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins. *J Biol Chem* 279:28689–28696.

Teo H, Gill D.J., Sun J., Perisic O., Veprintsev D.B., Vallis Y., Emr S.D., Williams R.L., (2006), ESCRT-I Core and ESCRT-II GLUE Domain Structures Reveal Role for GLUE in Linking to ESCRT-I and Membranes, *125(1)*, 99-111

Tien AC, Rajan A, Bellen HJ., (2009), A Notch updated., *J Cell Biol.*, 184(5):621-9.

Thompson , B.J. , J. Mathieu , H.H. Sung , E. Loeser , P. Rorth , and S.M. Cohen, (2005), Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in *Drosophila* . *Dev. Cell* . 9 : 711 – 720 .

Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH., (2003), The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family., *Plant Cell*, 15(8):1749-70.

Tsang HT, Connell JW, Brown SE, Thompson A, Reid E, Sanderson CM., (2006), A systematic analysis of human CHMP protein interactions: additional MIT domain-containing proteins bind to multiple components of the human ESCRT III complex., *Genomics*, 88(3):333-46.

U.

Usami, Y., Popov, S. & Gottlinger, H. G., (2007), J. Virol., Potent rescue of human immunodeficiency virus type 1 late domain mutants by ALIX/AIP1 depends on its CHMP4 binding site., 81, 6614–6622

Usami, Y., Popov, S., Popova, E. & Gottlinger, H. G., (2008), Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase. *J. Virol.* 82, 4898–4907

Urwin H, Ghazi-Noori S, Collinge J, Isaacs A., (2009), The role of CHMP2B in frontotemporal dementia., *Biochem Soc Trans.*37(Pt 1):208-12.

Urwin H, Authier A, Nielsen JE, Metcalf D, Powell C, Froud K, Malcolm DS, Holm I, Johannsen P, Brown J, Fisher EM, van der Zee J, Bruyland M; FReJA Consortium, Van Broeckhoven C, Collinge J, Brandner S, Futter C, Isaacs AM., (2010), Disruption of endocytic trafficking in frontotemporal dementia with CHMP2B mutations., *Hum Mol Genet.*, 19(11):2228-38

V.

Vaccari T, Bilder D., (2005), The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking., *Dev Cell.*, 9(5):687-98.

Vaccari T, Lu H, Kanwar R, Fortini ME, Bilder D., (2008), Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*., *J Cell Biol*, 180(4):755-62.

Vajjhala PR, Catchpoole E, Nguyen CH, Kistler C, Munn AL., (2007), Vps4 regulates a subset of protein interactions at the multivesicular endosome., *FEBS J.*, 274(8):1894-907.

VerPlank, L., Bouamr, F., LaGrassa, T. J., Agresta, B., Kikonyogo, A., Leis, J. & Carter, C. A. (2001). Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 7724–7729.

Volkov V.V. and D. I. Svergun D.I. (2003). Uniqueness of ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* 36, 860-864.

W.

Wang J, Peng Q, Lin Q, Childress C, Carey D, Yang W., (2010), Calcium activates Nedd4 E3 ubiquitin ligases by releasing the C2 domain-mediated auto-inhibition., *J Biol Chem*, 285(16):12279-88.

Watson, K.L., Justice, R.W., Bryant, P.J., (1994), Drosophila in cancer research: the first fifty tumor suppressor genes. *J. Cell Sci. Suppl.* 18, 19–33.

Wegner S.C., Lina M.W., Stenmark R. and Stenmark H. (2011), ESCRT proteins and cell signalling, *Traffic*, Accepted Article

Weidberg H, Elazar Z., TBK1 Mediates Crosstalk Between the Innate Immune Response and Autophagy., *Sci Signal.*, 4(187):pe39

Weiss ER, Popova E, Yamanaka H, Kim HC, Huibregtse JM, Göttlinger H., (2010), Rescue of HIV-1 release by targeting widely divergent NEDD4-type ubiquitin ligases and isolated catalytic HECT domains to Gag., *PLoS Pathog.*;6(9). pii: e1001107.

Weiss ER, Göttlinger H., (2011), The Role of Cellular Factors in Promoting HIV Budding., *J Mol Biol.*, 410(4):525-33.

Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, Richter B, Korac J, Waidmann O, Choudhary C, Dötsch V, Bumann D, Dikic I., (2011), Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth., *Science*, 333(6039):228-33

Wilkin MB, Carbery AM, Fostier M, Aslam H, Mazaleyrat SL, Higgs J, Myat A, Evans DA, Cornell M, Baron M., (2004), Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins., *Curr Biol.*, 14(24):2237-44.

Williams RL, Urbé S., (2007), The emerging shape of the ESCRT machinery, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5):355-68.

Whitley P, Reaves BJ, Hashimoto M, Riley AM, Potter BV, Holman GD., (2003), Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization., *J Biol Chem.*, 278(40):38786-95.

Wollert T, Hurley JH., (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes., *Nature*, 464(7290):864-9

Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH., (2009), Membrane scission by the ESCRT-III complex., *Nature*, 458(7235):172-7

X.

Xiao J., Chen X.W., Davies B.A., Saltiel A.R., Katzmann D.J., Xu Z., (2009), Structural Basis of Ist1 Function and Ist1–Did2 Interaction in the Multivesicular Body Pathway and Cytokinesis, *Mol Biol Cell*, 20(15): 3514–3524.

Xiao J, Xia H, Yoshino-Koh K, Zhou J, Xu Z., (2007), Structural characterization of the ATPase reaction cycle of endosomal AAA protein Vps4., *J Mol Biol.*, 374(3):655-70

Xiao J, Xia H, Zhou J, Azmi IF, Davies BA, Katzmann DJ, Xu Z., (2008), Structural basis of Vta1 function in the multivesicular body sorting pathway., *Dev Cell.*, 14(1):37-49

Xie X, Zhang D, Zhao B, Lu MK, You M, Condorelli G, Wang CY, Guan KL., (2011), IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation., *Proc Natl Acad Sci U S A.*,108(16):6474-9.

Y.

Yamamoto S, Charng WL, Bellen HJ., (2010), Endocytosis and intracellular trafficking of Notch and its ligands., *Curr Top Dev Biol.* 92:165-200.

Yang D., Rismanchi N., Renvoisé B., Lippincott-Schwartz J., Blackstone C., Hurley J.H., (2008), Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(12):1278-86

Yang D, Hurley JH., (2010), Structural role of the Vps4-Vta1 interface in ESCRT-III recycling., *Structure*, 18(8):976-84.

Yeo SC, Xu L, Ren J, Boulton VJ, Wagle MD, Liu C, Ren G, Wong P, Zahn R, Sasajala P, Yang H, Piper RC, Munn AL., (2003), Vps20p and Vta1p interact with Vps4p and function in multivesicular body sorting and endosomal transport in *Saccharomyces cerevisiae.*, *J Cell Sci.*, 116(Pt 19):3957-70.

Yondola M, Carter C., (2011), Un-"ESCRT"-ed Budding., *Viruses*, 3(1):26-31.

Yorikawa C, Shibata H, Waguri S, Hatta K, Horii M, Katoh K, Kobayashi T, Uchiyama Y, Maki M., (2005), Human CHMP6, a myristoylated ESCRT-III protein, interacts directly with an ESCRT-II component EAP20 and regulates endosomal cargo sorting., *Biochem J.*, 387(Pt 1):17-26.

Yu Z, Gonciarz MD, Sundquist WI, Hill CP, Jensen GJ. Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p.,(2008), *J Mol Biol*, 377:364–377.

Z.

Zamborlini A, Usami Y, Radoshitzky SR, Popova E, Palu G, Göttlinger H., (2006), Release of autoinhibition converts ESCRT-III components into potent inhibitors of HIV-1 budding., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(50):19140-5.

van der Zee J, Urwin H, Engelborghs S, Bruyland M, Vandenberghe R, Dermaut B, De Pooter T, Peeters K, Santens P, De Deyn PP, Fisher EM, Collinge J, Isaacs AM, Van Broeckhoven C., (2008), CHMP2B C-truncating mutations in frontotemporal lobar degeneration are associated with an aberrant endosomal phenotype in vitro. *Hum Mol Genet* 17: 313-322

Zhadina M, Bieniasz PD., (2010), Functional interchangeability of late domains, late domain cofactors and ubiquitin in viral budding., *PLoS Pathog.*, 6(10):e1001153.

Zhao M, Li XD, Chen Z., (2010), CC2D1A, a DM14 and C2 domain protein, activates NF-kappaB through the canonical pathway., J Biol Chem. 285(32):24372-80.

Zhao M, Raingo J, Chen ZJ, Kavalali ET., (2011), Cc2d1a, a C2 domain containing protein linked to nonsyndromic mental retardation, controls functional maturation of central synapses., J Neurophysiol.,105(4):1506-15

Résumé

Le bourgeonnement est l'étape finale du cycle viral du virus VIH. Les particules virales vont devoir modifier la topologie de la membrane plasmique afin de promouvoir leur libération dans le milieu extracellulaire ; cette étape est réalisée par le recrutement de protéines ESCRT (en particulier CHMP4 et CHMP2) au point de bourgeonnement. A ce jour, les détails moléculaires de ce recrutement sont méconnues.

Lethal Giant Discs (LgD) a été décrite dans la littérature comme un régulateur du trafic endosomal, et une interaction avec CHMP4B a été proposée pour l'orthologue humain CC2D1A. Un point majeur de ce travail aura été de caractériser l'interaction CC2D1A.CHMP4B, mais également de mieux comprendre l'organisation de la protéine. En particulier j'ai résolu la structure d'un fragment de LgD à 2.4Å, comprenant une région hélicale et un domaine C2 en c-terminal.

En outre, nous montrons que CC2D1A inhibe la capacité de CHMP4B à polymériser in vitro. A partir d'une structure cristallographique de CHMP4B et de données biochimiques, nous montrons que le site d'interaction de CC2D1A sur CHMP4B est impliqué dans la polymérisation de CHMP4B, et important pour la fonction de la protéine.

Un projet parallèle m'a également conduit à définir un protocole de purification de la protéine CHMP2B recombinante sous forme monomérique, cet isoforme ayant été récemment impliqué dans la formation de structures tubulaires à la membrane plasmique et dans des activités de scission membranaire. En particulier, j'ai pu caractériser la protéine en présence de liposomes et préciser de nouveaux partenaires cellulaires.

Abstract

Budding is the final step of HIV infection. Viral particles will have to modify the topology of the plasma membrane in order to achieve their correct release from the infected cell, by recruiting ESCRT proteins at the budding point, and among them CHMP4 and CHMP2 isoforms. So far, the molecular details of this recruitment are not precisely known..

Lethal Giant Discs (LgD) has been described in the literature as a regulator of endosomal trafficking, and an interaction with CHMP4B has been proposed. A major point of this research is to provide a structural basis for this interaction, as well as a better understanding of the role and general organization of LgD/CC2D1A. The crystal structure of a LgD fragment (comprising a predicted coiled-coil motif and a c-terminal C2 domain) was solved in our lab at 2.4Å..

Moreover, we show that CC2D1A impairs in vitro the ability of CHMP4B to polymerize. Based on a crystallographic structure of CHMP4B and biochemical data, we also show that the binding site of CC2D1A on CHMP4B is itself involved in polymerization.

As a side project, I've also set up a protocole to obtain pure monomeric CHMP2B, which has been shown to polymerize at the plasma membrane, and I've characterized the protein in the presence of liposomes, along with new partners.