



**ACADEMIA ROMÂNĂ  
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE**

**Rezumatul tezei de doctorat cu titlul:**

**Procese reglatoare ale căilor de transport  
vezicular în celulele  $\beta$ -pancreatice.  
Identificarea interactorilor proteinei  
EDEM1 din calea ERAD**

**Coordonator științific  
Dr. Andrei-José Petrescu**

**Doctorand  
Florin Pastramă**

**BUCUREȘTI**

**2015**

<b>CUPRINS:</b>	i
Mulțumiri	iii
Lista de abrevieri	iv
Scopul lucrării	vii
1. INTRODUCERE	1
1.1 Diabetul și disfuncțiile sintezei și secreției insulinei	1
1.2 Biosinteza, controlul, sortarea și traficul proteinelor de-a lungul căii secretorii	4
1.3 Degradarea asociată reticulului endoplasmic	13
1.4 Metode de identificare a proteinelor intracelulare și interactomului	18
2 MATERIALE ȘI METODE	27
2.1 MATERIALE	27
2.1.1 Echipamente	27
2.1.2 Software	27
2.1.3 Materiale, soluții și tamponane	28
2.1.3.1 Substanțe	28
2.1.3.2 Materiale utilizate în metodele de culturi celulare	29
2.1.3.3 Materiale folosite în metodele de biologie moleculară	29
2.1.3.4 Materiale folosite în metodele de biochimie analitică	30
2.1.3.5 Materiale utilizate în spectrometria de masă	34
2.2 METODE	35
2.2.1 Tehnici de culturi celulare	35
2.2.2 Tehnici de biologie moleculară	37
2.2.3 Tehnici de biochimie analitică și determinări proteomice	39
2.2.4 Condiționarea probelor și determinări MS	44
2.2.5 Analiza datelor MS asistată computațional	46
2.2.6 Teste preliminare asupra condiționării probelor proteomice	47
2.2.6.1 Identificarea expresiei proteinei wt-EDEM1 în lizate celulare	47
2.2.6.2 Identificarea unor posibili interactori ai EDEM1 prin IP și MS	49
2.2.6.3 Determinarea limitei de detecție a spectrometrului de masă folosind proteina BSA	51
2.2.6.4 Testarea tamponanelor de liză pentru analiza prin spectrometrie de masă	53
3 REZULTATE	56
3.1 Rolul EDEM 1 în ER și transportul vezicular în celula β pancreatică	56
3.1.1 Identificarea interactorilor din ER și transportul vezicular al EDEM1 în linia INS-1	56
3.2 EDEM 1 în alte linii celulare în condiții normale și sub efectul inhibitorilor glicozilării	67
3.2.1 Studii in linii de melanom	67
3.2.1.1 Identificarea interactorilor lui wt-EDEM1 în linia A375	67
3.2.1.2 Identificarea interactorilor tirozinazei în celulele A375	76
3.2.2 Investigarea efectului NB-DNJ în linia HEK293T	82
3.3 Investigarea rolului domeniului IDD al EDEM1 prin interactomică diferențială	88
3.3.1 Identificarea interactorilor lui Δ-EDEM1 și wt-EDEM1 în linia HEK293T	88
3.4 Analiza comparativă a interactoamelor EDEM1 în liniile INS-1, A375 și HEK293T	100
Concluzii finale	105
Lista de publicații:	108
Bibliografie	110

## Mulțumiri

Această lucrare a fost realizată în cadrul proiectului ”Doctoratul în Științe fundamentale – începutul unei cariere de vârf în cercetare”, cofinanțat de Uniunea Europeană și Guvernul României din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, contractul de finanțare nr. POSDRU/107/1.5/S/82514.



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI  
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,  
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI  
PERSONELOR VÂRSTNICE  
AMPOSDRU



Fondul Social European  
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale  
2007-2013



MINISTERUL  
EDUCAȚIEI  
NAȚIONALE

OIPOSDRU



INSTITUTUL DE MATEMATICĂ  
SIMION STOILOW  
AL ACADEMIEI ROMÂNE

### Investește în oameni !

FONDUL SOCIAL EUROPEAN

Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007 - 2013

Axa prioritară nr.1 „Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”

Domeniul major de intervenție 1.5 “Programe doctorale și post-doctorale în sprijinul cercetării”

Titlul proiectului: “**Doctoratul în științe fundamentale - începutul unei cariere de vârf în cercetare**”

Beneficiar: **Institutul de Matematică “Simion Stoilow” al Academiei Române**

Numărul de identificare al contractului: **POSDRU/107/1.5/S/82514**

Doresc să mulțumesc tuturor colegilor din cadrul Departamentului de Biologie Moleculară a Celulei (DBMC) și Departamentului de Biochimie Structurală și Bioinformatică (DBSB) care m-au ajutat în mod constant în munca de zi cu zi precum și în elaborarea tezei. În mod special doresc să aduc cele mai calde mulțumiri: Drd. Cristian Munteanu, Dr. Marioara Chirițoiu, Drd. Gabriela Chirițoiu și Drd. Petruța Alexandru cu care am colaborat în mod strâns în proiectele care au stat la studiile prezentate în această teză, precum și Doamnei director Dr. Ștefana Petrescu șef al DBMC, și coordonatorului de doctorat Dr. Andrei Petrescu șef al DBSB care m-au îndrumat pe tot parcursul stadiului doctoral.

Nu în ultimul rând gândurile mele se îndreaptă, și doresc să mulțumesc părinților mei, și întregii familii pentru grija cu care m-au înconjurat de-a lungul întregului drum pe care l-am parcurs până acum.

## Scopul lucrării

Scopul studiilor prezentate în această lucrare a fost acela de a investiga rolul EDEM1 (ER Degradation-Enhancer alpha-Mannosidase like 1) în mecanismele moleculare ale căii de degradare asociate Reticulului Endoplasmic (ERAD) - în cazul particular al *liniilor pancreatice INS-1*, pentru a înțelege cadrul generic în care disfuncțiile sintezei și secreției insulinei conduc la instalarea diabetului zaharat. Principalele obiective pe care le-am urmărit au fost identificarea interactorilor EDEM1, cu precădere a celor rezidenți în ER, precum și determinarea modului prin care EDEM1 selecționează și transportă proteinele pliate incorect.

În timp ce proteinele corect pliate pot să părăsească reticulul endoplasmic, fiind direcționate pe calea secretorie spre situsurile de destinație, copiile incorect pliate sunt recunoscute și trimise spre degradare direct din ER pe calea ERAD. Datorită acumulării proteinelor pliate greșit în ER, perturbațiile de-a lungul acestei căi pot conduce la multiple boli precum fibroza cistică, Parkinson și diabetul.

Pentru a fi secretate sau degradate proteinele trec printr-o etapă de control al calității ER în care starea lor de pliere este testată. Una din principalele proteine implicate în primele etape ale ERAD în recunoașterea proteinelor pliate greșit este considerată a fi EDEM1.

Prin utilizarea unei palete largi de metode precum cele de culturi celulare, biologie moleculară, biochimie analitică și preparativă și spectrometrie de masă - prezentele studii s-au concentrat pe identificarea complexelor ERAD formate de EDEM1 în linia  $\beta$  pancreatice INS-1 în comparație cu alte linii celulare precum HEK293T și linia de melanom uman A375, în condiții normale și de supraexprimare. Proteina EDEM1 endogenă sau supraexprimată a fost imunoprecipitată cu anticorpi specifici iar proteinele co-immunoprecipitate au fost identificate prin spectrometrie de masă (MS), urmărindu-se în special nivelul celor implicate în ERAD.

Ținând cont de rezultatele recente care au demonstrat implicarea domeniului de dezordine intrinsecă al EDEM1 în recunoașterea proteinelor trimise spre degradare - au fost investigate comparativ seturile de interactori specifici formelor EDEM1 sălbatică (wt) și cea mutantă ( $\Delta$ ) - construită în laborator prin eliminarea domeniului de dezordine intrinsecă. Și în acest caz a fost folosită spectrometria de masă pentru a compara seturi de interactori pentru wt-EDEM1 și  $\Delta$ -EDEM1 implicați în recunoașterea și dislocarea proteinelor pliate greșit din ER în citosol. Prin identificarea și validarea interactorilor proteinei EDEM1 în contexte celulare cu funcții specifice în patologia secreției insulinei comparativ cu alte tipuri de celule, lucrarea aduce contribuții în domeniul clarificării funcției acestei proteine în procesele de sinteză și degradare a proteinelor în condiții normale și patologice.

## INTRODUCERE

Proteinele destinate căii secretorii sunt pliate în ER, procesate în aparatul Golgi și apoi trimise prin transport vezicular spre compartimentul celular de destinație. Plierea și degradarea proteinelor în ER este mediată de sistemul de control al calității ER (ERQC). Plierea corectă în ER este asigurată de numeroase chaperoane iar controlul plierii este asigurat prin așa numitul ciclu al calnexinei în care N-glicanii atașați cotranslațional joacă un rol esențial ([Guerriero and Brodsky, 2012](#); [Helenius and Aebi, 2004](#)). Proteinele care nu pot fi reglicozilate de UGGT1 pentru a se plia corect în ER sunt separate ireversibil din ciclul CNX/CTR și devin substraturi ERAD, fiind trimise în calea ERAD. Degradarea substraturilor ERAD pare a implica tăierea manozei extinse a substraturilor până la Man<sub>5-6</sub> ([Hosokawa et al., 2009](#); [Quan et al., 2008](#)).

În calea ERAD este implicată și proteina EDEM1 omoloagă cu manozidazele din ER cu rol în semnalizarea și recunoașterea substraturilor ERAD ([Marin et al., 2012](#)). EDEM1 se leagă la substraturile ERAD fără a fi nevoie de tăierea glicanilor substrat sau glicozilarea substraturii ([Cormier et al., 2009](#)). EDEM1 se leagă la proteine non-native și direcționează proteine aberante la complexul de dislocare și ubicuitinare din membrana ER care conține SEL1L, prin interacția de tip lectinic cu SEL1L ([Cormier et al., 2009](#)). Proteinele incomplet pliate care transportă N-glicani sunt extrase din ciclul CNX/CTR prin intervenția EDEM1, EDEM2 și EDEM3 care induc stres în ER ([Olivari and Molinari, 2007](#)). Inhibiția tăierii manozei de către ER ManI previne acumularea de substraturi ERAD în ERQC, posibil ca urmare a inhibării recunoașterii de către OS-9 și XTP3-B (ERLEC).

Mașinăria responsabilă de recunoașterea substraturilor ERAD trebuie să fie capabilă să recunoască defectele din timpul plierii. Disfuncționalitățile ERAD duc la acumularea proteinelor pliate greșit în ER ceea ce conduce la multiple boli grave precum fibroza cistică, Parkinson și *diabetul*.

Celulele  $\beta$ -pancreatice sunt cele mai abundente celulele endocrine din insulele lui Langerhans, la nivelul lor având loc sinteza și secreția insulinei. Atunci când procesele de sinteză și secreție ale insulinei sunt perturbate, apare diabetul. Insulina este un hormon peptidic cu 51 de aminoacizi, având un rol cheie în reglarea homeostaziei glucozei. Sinteza insulinei începe cu transcripția genei pentru insulină și se termină cu formarea insulinei și a peptidului C. Secreția insulinei și absorbția glucozei sunt mediate de complexecele miezului proteinelor SNARE alcătuite din sintaxină, SNAP-23/25 și VAMP ([Jewell et al., 2010](#)).

Deoarece identificarea interactorilor EDEM1 în diversele linii celulare se bazează în mare parte pe spectrometria de masă, tehnică proteomică de ultimă generație, un subcapitol a fost dedicat spectrometriei de masă. MS a devenit în ultimii ani o tehnică din ce în ce mai folosită în analiza proteomelor și interactoarelor în condiții normale și patologice. MS implică mai multe metode de ionizare iar dintre acestea am folosit ionizarea prin electropulverizare (ESI: *ElectroSpray Ionisation*) care presupune trecerea ionilor unui analit dintr-un lichid în ioni în fază gazoasă. În această lucrare am folosit cromatograful nano-lichid EASY - nLC II cuplat direct cu un instrument LTQ Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific) din Institutul de Biochimie al Academiei Române (IBAR). MS presupune separarea ionilor în funcție de raportul m/z, iar pe lângă acest lucru poate realiza fragmentarea analiților, procedeu cunoscut sub numele de *spectrometrie de masă în tandem* (MS/MS) în care se pot obține informații despre secvența de aminoacizi. Studiile s-au bazat pe proteomica bottom-up, tehnică prin care proteoliza completă a proteomului de studiat în peptide are loc cel mai adesea cu tripsină ([Gundry et al., 2009](#)).

Etapele premergătoare proteomicii bottom-up bazată pe MS/MS sunt: extragerea materialului proteic din proba biologică, pregătirea proteinelor ce urmează a fi supuse digestiei, digestia propriu-zisă și analiza peptidelor obținute. În proteomica bottom-up mai întâi sunt identificate peptidele din probă, iar apoi din peptidele identificate se assemblează o listă cu o minimă redundanță a proteinelor ce se pot regăsi în proba respectivă.

Foarte multe programe folosite la identificarea peptidelor și proteinelor în tehnica bottom-up pot prelua diverse informații din baze de date de pe web: adnotările GO (Gene Ontology) oferă informații despre compartimentele celulare, funcțiile moleculare și procesele biologice ([Ashburner et al., 2000](#); [Gene Ontology, 2015](#)), Pfam (Protein Families) sunt adnotări ale familiilor de proteine care au secvențe și funcții biologice similare ([Finn et al., 2014](#)), Entrez gene atribuie o identificare tuturor proteinelor transcrise de la gena corespondentă ([Maglott et al., 2011](#)) și modificările postranșionale de la UniProt ([UniProt, 2015](#)) care pot fi comparate cu modificările postranșionale găsite.

În proteomica bottom-up, abundența proteinelor poate fi determinată fie folosind numărul total de spectre MS2 asociate unei proteine (sau numărul de peptide), fie folosind aria integrată de sub peak pentru fiecare peptidă.

## REZULTATE

Experimentele s-au concentrat asupra studiilor de proteomică și interactomică efectuate pentru identificarea prin MS a interactorilor EDEM1 în liniile INS-1 (celule  $\beta$ -pancreatice de șobolan), A375 (celule de melanom uman amelanotic) și HEK293T (celule embrionare de rinichi uman), precum și a interactorilor tirozinazei în A375. Am folosit celule recoltate la pasaje diferite pentru eliminarea eventualelor erori generate de cultivarea celulelor.

În experimentele de MS pentru proteina EDEM1 am folosit INS-1 transfectate stabil cu wt-EDEM1 și vector retroviral pLPCX cu rol de control negativ, A375 transfectate stabil cu wt-EDEM1 și vector retroviral pLNCX cu rol de control negativ și HEK293T transfectate tranzient cu plasmid  $\Delta$ -EDEM1, plasmid wt-EDEM1 și vector mamalian pTriEx cu rol de control negativ. După transfecții, liza celulelor a fost făcută cu tampoane de liză care conțin detergenții 2% Chaps, 1% Triton X-100 sau 1% digitonină. Pentru imunoprecipitări am folosit anticorpi policlonali de iepure față de proteina EDEM1, ser preimun de iepure cu rol de control negativ și anticorpi policlonali de iepure față de proteina tirozinază cu rol de control nespecific pentru imunoprecipitare (IP), toți fiind produși în Departamentul Biologia Moleculară a Celulei (DBMC) din cadrul IBAR. Imunocomplexele au fost eluate de pe rășina proteină A cu tampoanele de eluție SEB sau Gly.

În experimentele de MS pentru proteina tirozinază, am folosit celule A375 transfectate stabil cu WT-TYR, ST-TYR și pLNCX. Liza celulelor a fost făcută cu PBS-T1%, IP cu anticorpi policlonali de iepure și anticorpi monoclonali de șoarece față de proteina tirozinază iar eluarea imunocomplexelor de pe rășini de proteină A sau G cu SEB și Gly.

Probele au fost denaturate în condiții reducătoare, separate prin SDS-PAGE și folosite în Western blotting pentru detecția proteinelor și Coomassie blue pentru analiza MS. Gelurile colorate cu CCB R-250 au fost prelucrate conform protocolului MS care presupune fracționarea gelului, reducerea, alchilarea și digestia proteinelor cu 5-10 ng/ $\mu$ L tripsină, urmată de extracția peptidelor și injecția acestora în spectrometrul de masă. Achiziția datelor a fost realizată cu programul Xcalibur v.2.2 iar analiza datelor cu programele Proteome Discoverer v.1.4 și MaxQuat v.1.412.

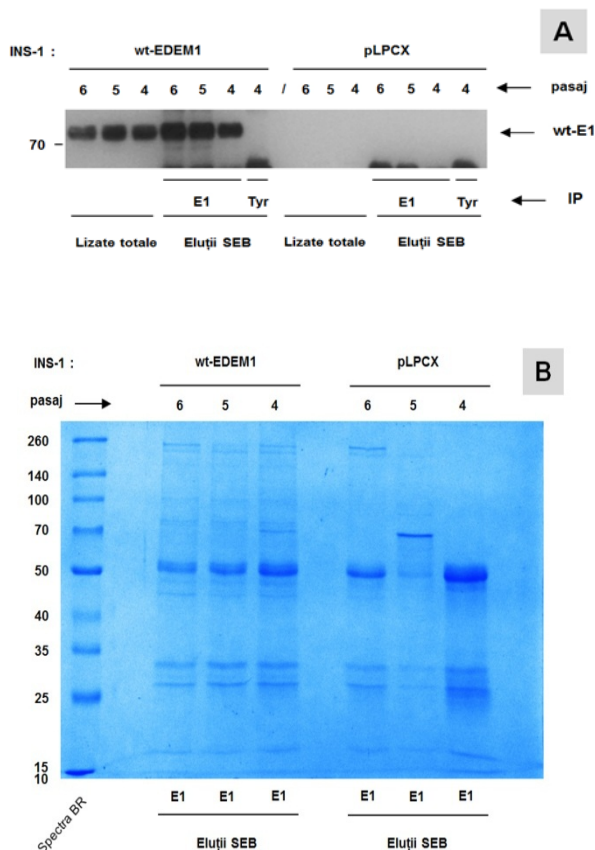
Experimentele au fost realizate în cadrul DBMC și Departamentul Bioinformatică și Biochimie Structurală (DBBS) din cadrul IBAR. Înaintea rezultatelor pe care le prezint mai jos, menționez faptul că am făcut mai multe teste de optimizări.

## Rolul EDEM1 în ER și transportul vezicular în celula β pancreatică

### Identificarea interactorilor din ER și transportul vezicular al EDEM1 în linia INS-1

Mai multe studii din ultimii ani au arătat că EDEM1 se leagă de proteinele pliate greșit ([Hosokawa et al., 2010](#); [Marin et al., 2012](#)). Rolul EDEM1 în calea ERAD nu este însă pe deplin înțeles iar această lucrare își propune să contribuie la înțelegerea rolului EDEM1 prin metode proteomice și interactomice bazate pe spectrometria de masă în celulele β-pancreatice INS-1 implicate în diabet, prin comparație cu alte linii celulare în care procesele de degradare s-au dovedit de asemenea a fi esențiale precum cele melanotice.

În primul subcapitol, studiile de proteomică și interactomică s-au axat pe identificarea prin MS a interactorilor wt-EDEM1 în linia INS-1. Pentru realizarea studiilor de MS am realizat două experimente de imunoprecipitare, folosind câte un control negativ diferit: ser preimun de iepure și vector gol pLPCX (Fig. 1).



**Figura 1.**

#### Identificarea wt-EDEM1 în imunoprecipitate prin Western blotting și Coomassie blue.

Celulele β-pancreatice INS-1 transfectate stabil cu wt-EDEM1 și pLPCX, aflate la pasajele 4, 5 și 6, au fost lizate cu Hepes Chaps 2%, imunoprecipitate cu anticorpi policlonali de iepure față de proteinele EDEM1 și tirozinază (drept control negativ) iar imunocomplexele au fost eluate cu SEB. Probele au fost denaturate în condiții reducătoare și separate prin SDS-PAGE.

(A) Lizatele totale și eluatele separate prin SDS-PAGE au fost transferate în sistem semiuscat pe membrană de nitroceluloză. Membrana a fost incubată cu anticorpi specifici pentru a detecta proteina wt-EDEM1.

(B) Eluatele au fost separate în gel de 10% poliacrilamidă. Gelul a fost colorat cu CBB R-250 apoi excizat în 4 fracții. Proteinele au fost reduse, alchilate și supuse digestiei cu 5 ng/μL tripsină iar amestecul de peptide a fost injectat în spectrometrul de masă din IBAR. Pentru a valida identificarea unei proteine am luat în considerare cel puțin 1 - 2 peptide unice cu încredere mare și 5 ppm pentru acuratețea masei.

După cum se poate observa în figura 1A, wt-EDEM1 a fost exprimată foarte bine în linia stabilă cu wt-EDEM1 în lizatele totale și în eluatele în cazul imunoprecipitării cu EDEM1.



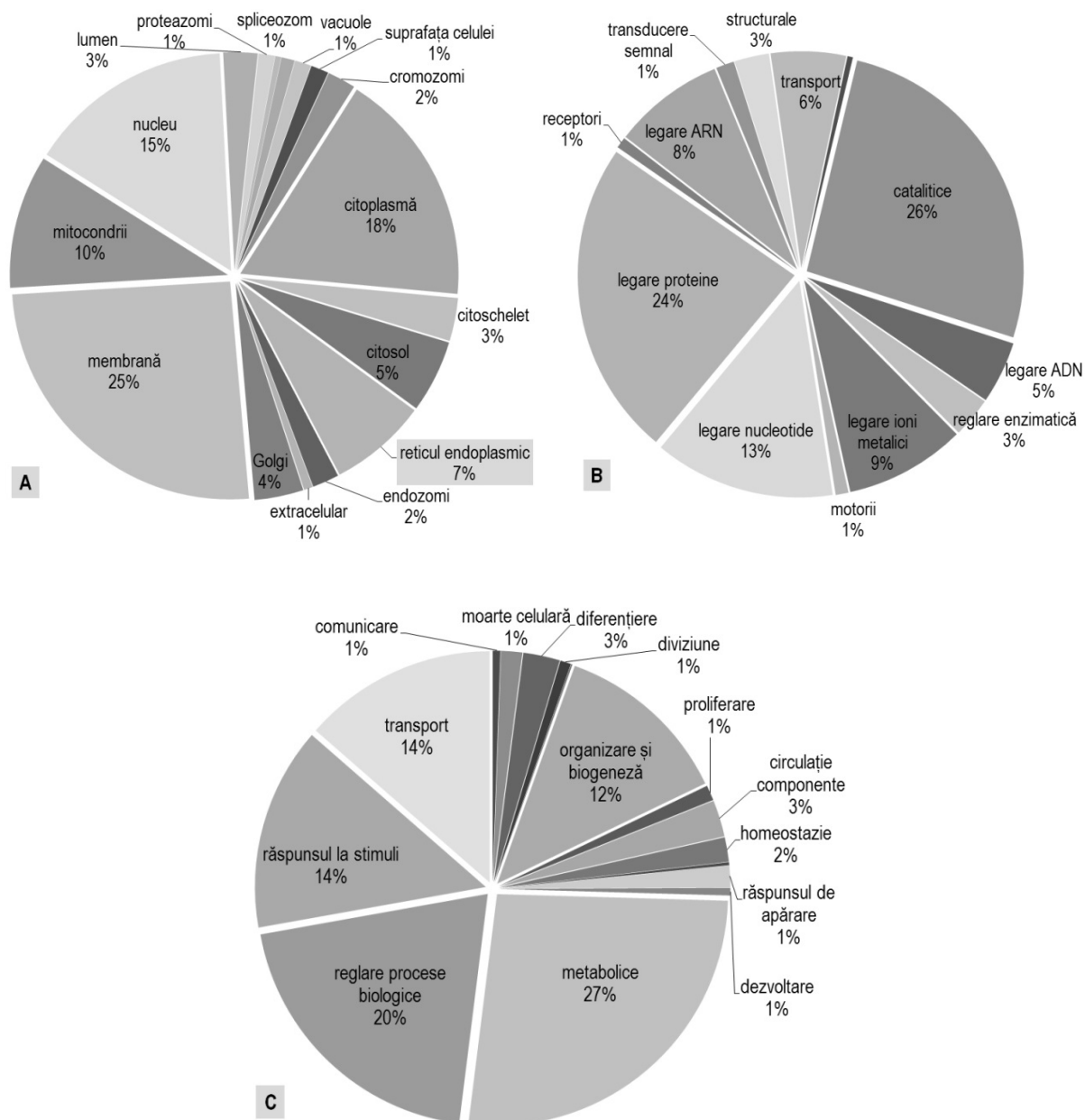
Prin MS am identificat wt-EDEM1 și o parte din interactorii săi cunoscuți, precum și posibili interactori identificați cu Proteome Discoverer (Tabel 1) și MaxQuant (Fig. 2) a tezei.

Proteinele specifice wt-EDEM1 din experimentul cu pLPCX, drept control negativ, au fost mai multe decât în experimentul cu controlul negativ de ser preimun, identificându-se 922 proteine din 1716 proteine totale, respectiv 399 din 1027 față de 630 din 2217, respectiv 176 din 1361 în cazul filtrării cu minim 1, respectiv 2 peptide unice. Cele mai semnificative rezultate în ceea ce privește valorile de la cuantificare și numărul de proteine identificate specific pentru wt-EDEM1 au fost în experimentul cu controlul negativ pLPCX. Din rezultatele mele se pare că imunoprecipitățile cu ser preimun conduc la obținerea unor rezultate fals pozitive datorate interacțiilor nespecifice.

În urma distribuirii proteinelor specifice wt-EDEM1 din experimentul cu controlul negativ pLPCX după compartimente celulare, funcții moleculare și procese biologice, atunci când am filtrat cu minim 2 peptide unice (Fig. 3), am observat că cele mai multe proteine specifice wt-EDEM1 sunt implicate în activitatea catalitică și legarea proteinelor și participă în procesele metabolice și în reglarea proceselor biologice, iar cele din ER și Golgi au fost 7%, respectiv 4%. Cele mai multe proteine specifice wt-EDEM1 au fost în pasajul 4 prin comparație cu pasajele 5 și 6.

Studiile de validare au dus la confirmarea interacțiilor între wt-EDEM1 și CALX, PDIA1, ERLEC și ERGIC-53. Este important de subliniat faptul că prin LC-MS/MS am demonstrat în premieră pe plan internațional asocierea directă dintre wt-EDEM1 și interactori cunoscuți din ERAD precum SEL1L, OS-9, ERLEC și SYVN1 (HRD1). Cu excepția proteinelor din familia PDI, studiile proteomice anterioare ([Jansen et al., 2012](#)) nu au reușit identificarea interactorilor wt-EDEM1 de mai sus.

Un alt set important de interactori ai wt-EDEM1 identificat în premieră internațională prin studiile întreprinse în cadrul prezentei lucrări este format din grupul de proteine AUP1, ERD2, ERLIN1 ERLIN2, HYOU1, Rab18, DNAJ 13 și UBA1. Aceste proteine au fost identificate foarte recent, practic acum 2 luni, prin metode proteomice ca fiind componente ale veziculelor lipidice cunoscute sub numele de *lipid droplets* ([Wang et al., 2015](#)). Acești interactori indică asocierea wt-EDEM1 cu vezicule derivate din membrana ER, inclusiv ERLIN și Rab18 asociate cu regiunile lipid raft sau zone bogate în colesterol din membrana ER. Semnalarea acestor interacții deschide perspective noi în înțelegerea funcției wt-EDEM1 prin asocierea acesteia cu transportul vezicular derivat din ER.



**Figura 3. Adnotarea ontologiei genei a compartimentelor celulare (A), funcțiilor moleculare (B) și proceselor biologice (C) pentru proteinele identificate specific cu wt-EDEM1 în experimentul cu pLPCX.**

## **Investigarea rolului EDEM1 în alte linii celulare în condiții normale și sub efectul unor inhibitori ai glicozilării**

Dacă în celula pancreatică reticulul endoplasmic este foarte activ în sinteza insulinei, fiind afectat puternic de stresul generat de abundența insulinei, în celulele canceroase se pare că există mecanisme adaptative la stresul de la nivelul ER, celulele fiind mai puțin afectate. În

acest context celular diferit, procesele în care este implicat EDEM1 pot fi asociate în diferite tipuri celulare cu actori celulari specifici. Pentru a discrimina între procesele în care este implicat EDEM1 în diferite tipuri de țesut, studiile au urmărit identificarea interactorilor lui wt-EDEM1 din linia metastatică de melanom uman A375, respectiv HEK293T.

### **Studii în linii de melanom. Identificarea interactorilor lui wt-EDEM1 în linia A375**

În acest subcapitol, pentru analiza MS am efectuat 3 experimente de IP pe linia A375 pentru a identifica interactorii wt-EDEM1.

Proteina wt-EDEM1 a fost exprimată foarte bine în toate experimentele în linia transdusă cu wt-EDEM1. Prin MS am identificat 544 proteine specifice wt-EDEM1 din 3718 proteine totale și 156 din 2471 în cazul filtrării cu minim 1, respectiv 2 peptide unice.

Proteinele specifice wt-EDEM1 au fost într-un procent relativ mic, ceea ce înseamnă probabil o calitate mai slabă a controlului pLNCX2. Pe de altă parte, este posibil ca în această linie de melanom să existe un număr mai mic de interactori ai wt-EDEM1 ținând cont că proteinele identificate în ER au fost într-un procent de 2%. Este de remarcat prezența interactorilor SEL1L, ERLEC și OS-9, ceea ce indică un complex asemănător celui întâlnit la celula  $\beta$ -pancreatică INS-1.

Studiile de validare au dus la confirmarea interacțiilor între wt-EDEM1 și SEL1L, OS-9, CALX, ERLEC, ERGIC-53, SEC31A, PDIA1, DERL-1, ERAP1, CALR și SEC23A și variabil cu UBA1. Prezența proteinelor SEC31A și SEC23A sugerează existența unui trafic al lui EDEM1 dincolo de ER, în aparatul Golgi. Am identificat noi interacții: între SEC23A și SEL1L, precum și între UBA1 și PDIA1; semnificația biologică a acestor interacții va necesita studii aprofundate de biologie celulară și moleculară pentru înțelegerea rolului acestor asocieri moleculare în traficul intracelular al proteinelor.

### **Studii în linii de melanom. Identificarea interactorilor tirozinazei în celulele A375**

Tirozinaza este o proteină importantă în melanom prin rolul său dovedit ca antigen tumoral. Tirozinaza și mutante solubile de tirozinază au fost intens studiate în laboratorul nostru, studiile demonstrând faptul că acești produși sunt interactori ai EDEM1 pe parcursul degradării lor în ER ([Marin et al., 2012](#)).

Scopul acestui subcapitol a fost de a identifica și a diferenția prin studii de MS între interactorii tirozinazei tipul sălbatic (WT-TYR) și mutanta sa solubilă (ST-TYR) supraexprimată în celulele A375 de melanom amelanotic. În acest studiu am făcut două experimente de IP cu 2 anticorpi, iar rezultatele cele mai semnificative au fost cele cu anticorpii monoclonali de șoarece.

În cazul probelor în care IP a avut loc cu anticorpi de șoarece, am identificat 203 proteine dintre care 43 specifice WT-TYR și 26 specifice ST-TYR. Pentru forma solubilă pliată greșit a tirozinazei destinată degradării, cei mai interesanți interactori sunt cei legați de calea secretorie și derivatele ei; dintre aceștia, SEC23-interacting protein este cel mai important, fiind implicat în transportul ER-Golgi mediat de COPII ([Amodio et al., 2013](#)). Această proteină este crucială în traficul proteinelor și poate media transportul formelor de tirozinază nepliate în citosol pentru degradarea proteazomală. Studiile viitoare vor confirma aceste rezultate prin folosirea de metode complementare. Rezultatele prezentate aici sugerează un trafic diferit pentru tipul sălbatic și forma mutantă a tirozinazei în celulele A375.

### **Investigarea efectului NB-DNJ în linia HEK293T**

NB-DNJ (N-butyl-deoxynojirimycin) este un inhibitor al  $\alpha$ -glucozidazelor I și II care previne tăierea N-glicanilor în ER și legarea calnexinei la precursorii monoglucozilați ai proteinelor, având loc astfel inhibiția procesării N-glicanilor. În prezența NB-DNJ precum și a altor inhibitori ca deoxinojirimicin și castanospermina, tăierea primei glucoze este inhibată ([Negroiu et al., 2000](#)). NB-DNJ afectează dramatic calea de pliere a lanțului polipeptidic în curs de formare și inhibă legarea calnexinei la proteinele din ER. Este de așteptat ca NB-DNJ să afecteze sever trecerea produșilor defectos pliați pe calea ERAD și să afecteze interactomul proteinei EDEM1. Pentru a determina care sunt efectele asupra N-glicozilării și ce seturi de interactori pentru wt-EDEM1 se modifică, pentru analiza MS am efectuat 2 experimente de imunoprecipitare folosind linia HEK293T care a fost sau nu tratată cu NB-DNJ.

În urma experimentelor de Western blotting, wt-EDEM1 a fost exprimată foarte bine în ambele experimente. Atunci când celulele au fost tratate cu NB-DNJ, wt-EDEM1 a fost exprimat la o masă moleculară mai mare în comparație cu situația în care nu a avut loc tratamentul.

Prin MS am identificat 2078 proteine cu minim 1 peptidă unică. Dintre acestea, 132 au fost specifice wt-EDEM1 + NB-DNJ, 128 specifice wt-EDEM1 și 51 comune. Atunci când am filtrat cu minim 2 peptide unice, am identificat 14 proteine specifice wt-EDEM1, 11 specifice wt-EDEM1 + NBDNJ și 30 comune. Proteinele specifice wt-EDEM1 în prezența tratamentului sunt mai multe decât cele în absența tratamentului.

Este de subliniat faptul că proteinele specifice wt-EDEM1 în prezența tratamentului sunt mai puține în ER (4%) și Golgi (3%) față de situația în care nu a avut loc tratamentul: ER (6%) și Golgi (5%). De asemenea, cele mai multe proteine identificate specific tratamentului sunt implicate în legarea proteinelor și în procesele metabolice.

Tratamentul cu NB-DNJ influențează activitatea wt-EDEM1. Astfel, spre deosebire de ERLEC și SEL1L, OS-9 nu mai este un partener de interacție pentru wt-EDEM1 în prezența NB-DNJ. Aceasta observație poate indica faptul că OS-9 interacționează cu wt-EDEM1 exclusiv în prezența substratului și acesta nu poate fi prezent în complex în probele tratate pentru că nu este recunoscut de calnexină.

## **Investigarea rolului domeniului IDD al EDEM1 prin interactomică diferențială**

### **Identificarea interactorilor lui $\Delta$ -EDEM1 și wt-EDEM1 în linia HEK293T**

Studii anterioare efectuate în cadrul laboratorului nostru au demonstrat că proteina EDEM1 conține pe lângă domeniul manozidazic de tip GH47 și un domeniu de dezordine intrinsecă (IDD) care are un rol fundamental în interacția cu proteinele depliate ([Marin et al., 2012](#)). În cazul formei  $\Delta$ , IDD situat între aminoacizii 48-119 a fost îndepărtat. Se cunoaște faptul că EDEM1 este capabil să extragă polipeptidele din ciclul calnexinei prin interacție directă cu calnexina ([Oda et al., 2003](#)), legarea EDEM1 la substrate ERAD necesită IDD și faptul că EDEM1 se asociază cu calnexina și SEL1L în absența IDD ([Marin et al., 2012](#)).

În acest subcapitol am comparat seturi de interactori ai formelor EDEM1 sălbatică (wt) și EDEM1 mutantă ( $\Delta$ ) în linia HEK293T. Am efectuat 2 experimente de IP pentru analiza MS, folosind câte un control negativ diferit: ser preimun de iepure și vector pTriEx. În primul experiment, liza a avut loc cu tampoane de liză cu 1% Triton și 2% Chaps, IP cu EDEM1 și ser preimun, iar eluția cu SEB și Gly, în timp ce în al doilea experiment liza a fost făcută cu 1% digitonină și 1% Triton, IP cu EDEM1 și eluția cu SEB.

În urma experimentelor de Western blotting s-a arătat că atât wt-EDEM1 cât și  $\Delta$ -EDEM1 au fost exprimate și detectate la masa moleculară corespunzătoare.

Prin MS, cele mai multe proteine identificate specific pentru  $\Delta$ -EDEM1 (992 proteine din 3889 proteine totale, respectiv 444 din 2812) au fost în situația în care am folosit 1% digitonină iar cele mai multe specifice pentru wt-EDEM1 (501 din 2569, respectiv 209 din 1751) au fost atunci când am folosit 1% Triton, filtrările fiind făcute cu minim 1, respectiv 2 peptide unice.

Proteinele specifice  $\Delta$ -EDEM1, specifice wt-EDEM1 și cele comune din experimentul cu controlul negativ pTriEx au fost mai multe decât în experimentul cu control negativ ser preimun în care s-au semnalat interacții nespecifice. În experimentul cu pTriEx, IP-ul s-a făcut cu anticorpi specifici față de proteina de interes în celule care exprimă această proteina și în celule control în care proteina nu este exprimată. În experimentul cu ser preimun, celulele care exprimă proteina investigată au fost imunoprecipitate cu anticorpi specifici sau cu ser obținut înainte de imunizare.

Din rezultatele de cuantificare ale experimentului cu controlul negativ pTriEx, cele mai multe proteine specifice pentru  $\Delta$ -EDEM1 au fost identificate în urma folosirii tamponului cu 1% digitonină; tot aici se observă și proteinele specifice și comune celor două forme ale lui EDEM1 în funcție de tamponul utilizat.

Proteina wt-EDEM1 interacționează cu mai multe proteine localizate în ER și Golgi decât proteina  $\Delta$ -EDEM1. Majoritatea proteinelor asociate cu ambele forme ale lui EDEM1 sunt implicate în funcția de legare a proteinelor și participă în procesele metabolice.

Interacțiile dintre EDEM1 și SEL1L, OS-9, ERLEC și DERL-1, proteine implicate în ERAD, sunt mult mai puternice pentru wt-EDEM1. Forma mutantă se asociază mai mult cu Sec61, Sec63 și Tram1 (componente ale transloconului), SRPR- $\beta$  (component al receptorului particulei de recunoaștere a semnalului) dar și cu KDELR2 (proteină implicată în traficul vezicular normal prin Golgi). Interacția dintre  $\Delta$ -EDEM1 și KDELR2 deschide o nouă ipoteză în legătură cu înțelegerea rolului EDEM1 în celule.

## Concluzii finale

- În cadrul tezei de doctorat a fost pus la punct un protocol proteomic de identificare a proteinelor prin imunoprecipitare și spectrometrie de masă LC-MS/MS pentru proteina EDEM1. Acest protocol presupune următoarele etape și condiții: liza celulelor, imunoprecipitarea cu anticorpi policlonali față de EDEM1, imobilizarea imunocomplexelor cu rășină de proteină A, eluarea imunocomplexelor și separarea lor electroforetică, reducerea, alchilarea și digestia enzimatică a proteinelor în peptide, și extracția peptidelor în vederea identificării prin spectrometrie de masă.
- Prin analiza MS se pot identifica la nivel de femtomolar interactori ai unor proteine de interes din extracte celulare purificate printr-o singură etapă de imunoprecipitare în condiții speciale care asigură păstrarea asocierii cu proteinele interactoare.
- Prin tehnica Western blotting s-a arătat că wt-EDEM1,  $\Delta$ -EDEM1, WT-TYR și ST-TYR au fost exprimate în linile celulare folosite. Rezultatele obținute în urma folosirii vectorilor pLPCX și pTriEx drept controale negative au fost mai elocvente față de controlul ser preimun de iepure. Au fost identificați puțini interactori pentru WT-TYR și ST-TYR probabil datorită faptului că tirozinaza are mai degrabă o funcție enzimatică decât de receptor. Au fost identificați un număr relativ mare de interactori pentru cele 2 forme ale lui EDEM1 precum și alți posibili interactori care trebuie confirmați prin teste suplimentare.
- S-a pus la punct un protocol de identificare a interactorilor enzimei tirozinază și a unei mutante solubile a acesteia întâlnită în albinism. Au fost identificate 43 proteine asociate cu tirozinaza și 26 proteine asociate cu mutanta solubilă. Identificarea receptorului pentru proteina sec23 (sec23-interacting protein) printre interactorii tirozinzei mutante indică existența unui trafic între ER și Golgi în procesul de degradare al acestei proteine.
- Un rezultat important al studiilor acestei teze de doctorat îl constituie evidențierea complexelor moleculare în care este implicată proteina EDEM1 în celulele  $\beta$  pancreatice secretoare de insulină. Evidențierea interacției EDEM1 cu proteinele OS-9, SEL1L, ERLEC, Synoviolin și Derlin-1 indică implicarea acestei proteine în procesele de

degradare a proteinelor pe calea ERAD. În plus, interacția consistentă cu calnexina arată că EDEM1 participă în cel puțin două complexe moleculare: unul în plierea proteinelor și celălalt în degradarea acestora. Implicarea EDEM1 în asocierea cu PDI în celula pancreatică sugerează un rol în formarea punților disulfurice ale insulinei.

- În cadrul tezei s-a evidențiat importanța alegerii tampoanelor și detergenților destinați extracției probelor din membranele celulare. O comparație între trei tipuri de detergenți a arătat că raportul molecular între EDEM1 și interactorii săi variază în funcție de detergenții utilizați. Astfel, studiile mele recomandă pentru LC/MS detergenții CHAPS și digitonină în defavoarea detergentului Triton X-100 folosit în majoritatea investigațiilor de spectrometrie de masă.
- Experimentele de LC/MS au arătat că în cazul proteinei EDEM1 și a mutantei acesteia, proteinele interactoare sunt implicate în ERAD, ERQC, plierea proteinelor, transportul vezicular bidirecțional între ER și Golgi, UPR, traficul endozomal, precum și alte procese importante în celulă. În timp ce wt-EDEM1 este implicat în complexe ale căii ERAD, mutanta  $\Delta$ -EDEM1 are o afinitate scăzută pentru proteinele OS-9, SEL1L și ERLEC dar predomină asocierea cu proteine componente ale transloconului: Sec61, Sec 63 și Tram1.
- Prin experimente de LC/MS am identificat proteinele care se asociază cu EDEM1 în condițiile în care procesul de N-glicozilare este inhibat la nivelul alfa-glucozidazelor I și II. În aceste condiții, EDEM1 nu mai interacționează cu OS-9 dar păstrează interacțiile cu ERLEC și SEL1L. Această observație poate indica faptul că OS-9 interacționează cu EDEM1 exclusiv în prezența substratului și acesta nu poate fi prezent în complex în probele tratate pentru că nu este recunoscut de calnexină.
- Pentru a investiga rolul EDEM1 în celula eucariotă, am comparat interactorii acestei proteine în mai multe linii celulare. Studiile au arătat că EDEM1 interacționează în toate liniile celulare investigate (celule pancreatice de șobolan, celule embrionare renale umane și celule de melanom uman) preponderent cu patru proteine rezidente în reticulul endoplasmic reprezentate de calnexina, OS-9, ERLEC și SEL1L, fiind implicate într-o cale de degradare a proteinelor asociată reticulului endoplasmic.



- Astfel, s-a demonstrat în premieră pe plan internațional asocierea dintre EDEM1 și OS-9, ERLEC, SEL1L și Synoviolin. Prin contrast, metodele proteomice folosite anterior nu au permis identificarea acestor interactori ai EDEM1, premițând identificarea doar a proteinelor din familia PDI.
- S-au identificat, în premieră internațională, proteine componente ale veziculelor lipid droplets în asociere cu EDEM1. Aceste vezicule fiind sediul degradării ApoB conduc la formularea unei noi ipoteze legate de rolul EDEM1 în calea ERAD asociată de lipid droplets.

## Bibliografie selectată

1. Amodio, G., Venditti, R., De Matteis, M.A., Moltedo, O., Pignataro, P., and Remondelli, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress reduces COPII vesicle formation and modifies Sec23a cycling at ERESs. *FEBS Lett* 587, 3261-3266.
2. Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.
3. Cormier, J.H., Tamura, T., Sunryd, J.C., and Hebert, D.N. (2009). EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex. *Mol Cell* 34, 627-633.
4. Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., *et al.* (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42, D222-230.
5. Gene Ontology, C. (2015). Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* 43, D1049-1056.
6. Guerriero, C.J., and Brodsky, J.L. (2012). The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev* 92, 537-576.
7. Gundry, R.L., White, M.Y., Murray, C.I., Kane, L.A., Fu, Q., Stanley, B.A., and Van Eyk, J.E. (2009). Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 10*, Unit10 25.
8. Helenius, A., and Aebi, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-1049.
9. Hosokawa, N., Kamiya, Y., Kamiya, D., Kato, K., and Nagata, K. (2009). Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans. *J Biol Chem* 284, 17061-17068.
10. Hosokawa, N., Tremblay, L.O., Sleno, B., Kamiya, Y., Wada, I., Nagata, K., Kato, K., and Herscovics, A. (2010). EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans. *Glycobiology* 20, 567-575.
11. Jansen, G., Maattanen, P., Denisov, A.Y., Scarffe, L., Schade, B., Balghi, H., Dejgaard, K., Chen, L.Y., Muller, W.J., Gehring, K., *et al.* (2012). An interaction map of endoplasmic reticulum chaperones and foldases. *Mol Cell Proteomics* 11, 710-723.
12. Jewell, J.L., Oh, E., and Thurmond, D.C. (2010). Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298, R517-531.
13. Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K.D., and Tatusova, T. (2011). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* 39, D52-57.
14. Marin, M.B., Ghenea, S., Spiridon, L.N., Chiritoiu, G.N., Petrescu, A.J., and Petrescu, S.M. (2012). Tyrosinase degradation is prevented when EDEM1 lacks the intrinsically disordered region. *PLoS One* 7, e42998.
15. Negroiu, G., Dwek, R.A., and Petrescu, S.M. (2000). Folding and maturation of tyrosinase-related protein-1 are regulated by the post-translational formation of disulfide bonds and by N-glycan processing. *J Biol Chem* 275, 32200-32207.
16. Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I., and Nagata, K. (2003). EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* 299, 1394-1397.
17. Olivari, S., and Molinari, M. (2007). Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins. *FEBS Lett* 581, 3658-3664.
18. Quan, E.M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K., and Weissman, J.S. (2008). Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Cell* 32, 870-877.
19. UniProt, C. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* 43, D204-212.
20. Wang, W., Wei, S., Li, L., Su, X., Du, C., Li, F., Geng, B., Liu, P., and Xu, G. (2015). Proteomic analysis of murine testes lipid droplets. *Sci Rep* 5, 12070.